

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE MODELOS MULTI-EVENTO CAPTURA-MARCAÇÃO-RECAPTURA  
PARA DETERMINAR PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS  
E O DESEMPENHO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICOS:  
EXEMPLO DA MIXOMATOSE E DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DO COELHO

Henrique Manuel Coelho Pacheco

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ORIENTADOR

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos  
Santos

COORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

2021



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE MODELOS MULTI-EVENTO CAPTURA-MARCAÇÃO-RECAPTURA  
PARA DETERMINAR PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS  
E O DESEMPENHO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICOS:  
EXEMPLO DA MIXOMATOSE E DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL DO COELHO

Henrique Manuel Coelho Pacheco

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida

VOGAIS:

Professora Doutora Maria Isabel Neto Cunha  
Fonseca

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos  
Santos

ORIENTADOR

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos  
Santos

COORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

2021

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Henrique Manuel Coelho Pacheco

Título da Tese ou Dissertação: Utilização de modelos multi-evento captura-marcação-recaptura para determinar parâmetros epidemiológicos e o desempenho de testes de diagnóstico serológicos: exemplo da mixomatose e doença hemorrágica viral do coelho

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☒ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 29 de julho de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Doutor Nuno Santos por ter aceite ser meu orientador, por me ter acompanhado ao longo desta minha última etapa. Quero agradecer por ter estado disponível e acessível sempre que precisasse, por oferecer o seu tempo para esclarecer qualquer dúvida que tivesse, por me ter ajudado a crescer como profissional. Quero ainda agradecer por todos os conselhos que me deu e que me ajudaram a planear os possíveis caminhos na minha futura carreira. Um grande obrigado (e espero que os meus pratos tenham ajudado)!

Um agradecimento ao Professor Telmo por me ter indicado o Doutor Nuno e por me ter dado as primeiras bases de estatísticas que foram bastante utilizadas ao longo deste trabalho. À professora Yolanda Vaz, por ter aceite ser a minha ligação com a Faculdade durante o estágio curricular e por ter mostrado sempre disponibilidade em qualquer dúvida que surgisse.

Um agradecimento a toda a equipa de Noudar, onde realizei muitas campanhas de capturas, e em especial ao senhor Manuel, por me ter sempre recebido com enorme simpatia e por ter partilhado muitos conhecimentos e experiências de vida!

Um agradecimento ao CIBIO por me ter dado a oportunidade de realizar o trabalho laboratorial necessário para a minha dissertação.

Um obrigado muito especial a todos aqueles que me acompanharam nestes 6 anos, que me apoiaram em todos os momentos, bons ou maus!

À Sara e à Raquel por todos os momentos partilhados, por todo o apoio, risos, almoços de sushi, festas e muito mais. Há amizades que se sabe logo que é para a vida!

Aos Salesvagens, por todas as viagens, almoços e jantares, por terem sido o grupo com quem partilhei este caminho desde o 1º dia e que espero continuar a partilhar muitos mais momentos! Ps: Obrigado Miguel!

Obrigado ao grupo dos Açores por ter tornado todos os momentos incríveis e divertidos, mesmo durante as longas noites de estudo em Santa Maria. Amizades que espero guardar para a vida!

Um obrigado à Maria, por ter sido uma pessoa tão importante e especial ao longo destes últimos quatro anos, por me ter acompanhado e ajudado sempre que precisei!

A toda a minha família que me apoiou sempre e que me motivou a alcançar os meus objetivos.

Ao meu irmão, por ser o meu parceiro de vida e para a vida.

À Indy, à Kyra e ao Lucky, por conseguirem nos piores dias fazerem-me sorrir. Por me terem ensinado a levar a vida com calma e felicidade, aproveitando todos os momentos.

Por fim, o obrigado mais especial do mundo aos meus pais pelos sacrifícios que sempre fizeram para que pudesse ter a melhor educação possível e que nunca me faltasse nada, por todos os ensinamentos de vida, por estarem sempre lá para mim e por me amarem incondicionalmente. Não há palavras para agradecer tudo o que me deram ao longo da minha vida. Irei daqui para a frente trabalhar para vos fazer orgulhosos de mim todos os dias. Esta tese é dedicada a vocês.

Obrigado mais uma vez a todos os que me acompanharam ao longo destes anos!

## RESUMO

O coelho bravo é uma espécie chave sendo responsável pelo equilíbrio de inúmeros ecossistemas, bem como pela manutenção de muitas espécies. Com o aparecimento da Mixomatose e da Doença Hemorrágica Viral, verificou-se um declínio muito acentuado do número de coelhos, o que levou a que esta espécie fosse considerada em risco de extinção.

Os estudos realizados em vida selvagem podem-se basear em estudos longitudinais, estimando parâmetros eco epidemiológicos. A grande maioria destes ensaios depende de dados serológicos e da exatidão dos testes de diagnóstico utilizados. As abordagens clássicas para estimar o desempenho diagnóstico dependem de outro ensaio assumido como referência ou de amostras de estado de infecção conhecido. Contudo, em estudos de vida selvagem ou com patógenos recentes, as abordagens descritas raramente se encontram disponíveis. Os dados recolhidos de ensaios longitudinais podem ser analisados através de modelos multi-eventos de captura-marcação-recaptura (MECMR), contabilizando a incerteza na atribuição do estado, enquanto determinam os parâmetros epidemiológicos pretendidos.

Com este estudo, procurou-se confirmar a hipótese de que, ao contabilizar a incerteza na atribuição de estados, os MECMR conseguem estimar o desempenho diagnóstico dos ensaios serológicos. Avaliou-se esta hipótese utilizando dados obtidos de duas populações da subespécie do sudoeste ibérico de coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus algerius*). As amostras recolhidas foram utilizadas para realizar um teste serológico para o vírus mixoma (MYXV) e três testes serológicos para o vírus da doença hemorrágica do coelho (DHV), dois para a variante GI.1 e um para a variante GI.2. Foi utilizado um método já comprovado, modelos de mistura finita, para determinar o ponto de corte ótimo e a Sensibilidade (Se) e a Especificidade (Sp) de cada um dos testes. Utilizou-se os MECMR para determinar qual o teste serológico mais eficaz, sendo este aquele que apresenta os valores de Se e Sp mais elevados. Por fim, comparou-se, num intervalo de pontos de corte, a variação da Se e da Sp entre os modelos MECMR e de mistura finita.

O teste serológico empregando antígenos GI.2 foi o mais eficaz para o vírus da DHV, apresentando resultados mais realistas quando comparado com os restantes testes. Nos pontos de corte ideais, as estimativas da Se e Sp foram totalmente concordantes entre os modelos MECMR e de mistura finita. A sobrevivência dos coelhos europeus seropositivos para MYXV ou DHV foi superior à dos coelhos seronegativos. Conclui-se que os modelos MECMR podem estimar, de forma fiável, o desempenho diagnóstico dos ensaios serológicos.

**Palavras-Chave:** Coelho bravo; Mixomatose; Doença Hemorrágica Viral; MECMR; modelos de mistura finita

## Abstract

The wild rabbit is a key species being responsible for the balance of numerous ecosystems, as well as for the maintenance of many other species. With the appearance of infectious diseases, Myxomatosis and Viral Haemorrhagic Disease, there has been a sharp decline in the total number of rabbits, which has led to this species being considered at risk of extinction.

Studies conducted in wildlife can be based on longitudinal studies, estimating eco-epidemiological parameters. The vast majority of these trials rely on serological data and the accuracy of the diagnostic tests used. Classical approaches to estimating diagnostic performance rely on another assay assumed as a reference or on samples of known infection status. However, in wildlife studies or with recent pathogens, the approaches described are rarely available. Data collected from longitudinal assays can be analysed using capture-marking-recapture multi-event models (MECMR), accounting for uncertainty in state assignment while determining the intended epidemiological parameters.

With this study, we sought to confirm the hypothesis that by accounting for uncertainty in state assignment, MECMRs can estimate the diagnostic performance of serological assays. We evaluated this hypothesis using data obtained from two populations of the southwestern Iberian wild rabbit subspecies (*Oryctolagus cuniculus algirus*). The samples collected were used to perform one serological test for myxoma virus (MYXV) and three serological tests for rabbit haemorrhagic disease virus (DHSV), two for the GI.1 variant and one for the GI.2 variant. A proven method, finite mixture models, was used to determine the optimal cutoff point and the Sensitivity (Se) and Specificity (Sp) of each of the tests. The MECMRs were used to determine which serological test was most effective, the one with the highest Se and Sp values. Finally, the variation in Se and Sp between the MECMR and finite mixture models was compared over a range of cut-off points.

The serological test employing GI.2 antigens was the most effective for HSV virus, showing more realistic results when compared to the other tests. At the optimal cut-off points, the estimates of Se and Sp were in complete agreement between the MECMR and finite mixture models. Survival of European rabbits seropositive for MYXV or RHDV was higher than that of seronegative rabbits. It is concluded that MECMR models can reliably estimate the diagnostic performance of serological assays.

**Keywords:** Wild rabbit; Myxomatosis; Rabbit Haemorrhagic Viral Disease; MECMR; finite mixture models



# ÍNDICE

Agradecimentos .....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
I – INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Descrição das atividades de estágio .....	1
1.2. Revisão bibliográfica .....	2
1.2.1. Coelho, a sua importância e condicionantes populacionais .....	2
1.2.2. Mixomatose .....	5
1.2.3. Doença – DHV estirpe original .....	7
1.2.4. Doença – DHV nova estirpe .....	9
1.2.5. Estado atual do coelho como espécie protegida .....	11
1.2.6. Modelos estatísticos – importância em estudos de vida selvagem .....	13
II – UTILIZAÇÃO DE MODELOS MULTI EVENTO CMR PARA DETERMINAR PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS E O DESEMPENHO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICOS .....	18
2.1. Objetivos .....	18
2.2. Materiais e métodos .....	18
2.2.1. Trabalho de campo .....	18
2.2.1.1. Área de estudo: .....	18
2.2.1.2. Recolha de amostras: .....	19
2.2.2. Trabalho de laboratório .....	20
2.2.3. Modelos multi-eventos e mistura finita .....	24
2.3. Resultados .....	36
2.3.1. Comparação entre testes .....	36
2.3.2. Desempenho de diagnóstico através de uma série de pontos de corte .....	38
2.3.3. Parâmetros epidemiológicos .....	41
2.4. Discussão .....	43
2.5. Limitações .....	47
III – CONCLUSÕES .....	48
BIBLIOGRAFIA .....	50
ANEXOS .....	55
ANEXOS	
Anexo 1 - Matrizes do Modelo da Mixomatose	
Anexo 2 - Parametrização dos modelos	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Captura e manipulação do coelho bravo .....	19
Figura 2 – Método de ELISA Indireto.....	21
Figura 3 – Protocolo do método de ELISA indireto .....	23
Figura 4 – Intervalo (em dias) entre campanhas. ....	27
Figura 5 – Exemplos de histórias de capturas de 6 coelhos .....	27

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras recolhidas de cada coelho-bravo capturado. ....	20
Tabela 2 – Estados iniciais relativos DHV .....	28
Tabela 3 – Eventos observáveis .....	28
Tabela 4 – Matriz dos estados iniciais. ....	29
Tabela 5 – Matriz de sobrevivência entre campanhas .....	29
Tabela 6 – Matriz de transição entre estados entre campanhas.....	30
Tabela 7 – Matriz da consciência da armadilha entre campanhas .....	30
Tabela 8 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser testado aquando a sua captura .....	30
Tabela 9 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser incorretamente identificado.....	31
Tabela 10 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser incorretamente identificado.....	31
Tabela 11 – Sero prevalência estimada para a Mixomatose e DHV nos locais de estudo .....	41
Tabela 12 – Sobrevivência mensal em coelhos seropositivos e seronegativos a Mixomatose .....	41
Tabela 13 – Sobrevivência mensal em coelhos seropositivos e seronegativos a DHV2 .....	41

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Probabilidade de seropositividade (vermelho) e ponto de corte selecionado (linha tracejada vertical) nos dados do sítio CL.....	36
Gráfico 2 - Desempenho de diagnóstico dos ensaios DHV2/teste 1, DHV2/teste 2 e DHV2/teste 3 no corte ótimo, estimado por modelos de captura-marcação-recaptura multi-eventos.....	37
Gráfico 3 - Desempenho de diagnóstico do DHV2/ensaio 1 através de uma gama pontos de corte estimados por modelos de captura-marcação-recaptura multi-eventos e de mistura finita. ....	38
Gráfico 4 - Sensibilidade diagnóstica e Especificidade do MYXV/ensaio 4 através de uma gama de pontos de corte, estimada por modelos de captura-marcação-recaptura de múltiplos eventos e mistura finita. ....	39
Gráfico 5 - Diferença entre as estimativas de desempenho de diagnóstico obtidas através de modelos de captura-mistura de vários eventos e de mistura finita numa gama de pontos de corte. ....	40
Gráfico 6 - Sobrevivência mensal dos coelhos europeus, estimada por modelos de captura-marcação-recaptura multieventos, por estado serológico e local de estudo.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIC	Critério de Informação de Akaike
CMR	Captura Marcação Recaptura
CL	Companhia das Lezírias
DHV	Doença Hemorrágica Viral
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
GOF	<i>Goodness-of-fit</i>
Ig	Imunoglobulina
MECMR	Multi Evento Captura Marcação Recaptura
MYXV	Mixomatose
ND	Noudar
OD	Densidade Ótica
Se	Sensibilidade
Sp	Especificidade
VPL	<i>Virus Like Particles</i>

## **I – INTRODUÇÃO**

### **1.1. Descrição das atividades de estágio**

A realização do estágio curricular insere-se no plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), tendo como objetivos principais a aprendizagem de novos conhecimentos e o aprofundamento de outros já obtidos em diversas áreas da medicina veterinária.

O estágio curricular decorreu entre 1 de Março e 1 de Dezembro de 2020, sob a orientação do Doutor Nuno Santos, sendo este dividido em três diferentes componentes, trabalho de campo, trabalho de laboratório de análise de amostras e análise estatística.

A componente de trabalho de campo foi composta por 7 campanhas de captura cada uma com duração entre 5-7 dias nos locais Companhia das Lezírias e Noudar. Durante cada campanha, realizava-se a preparação das armadilhas 3 horas antes do pôr do sol, 2 rondas de monitorização (2 horas após o pôr-do-sol e 1 hora após o nascer do sol) e manipulação de cada coelho capturado (colocação de chip, recolha de amostras biológicas, medições corporais, entre outros).

O trabalho de laboratório foi realizado entre 15 de Novembro e 20 de Novembro no CIBIO (Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos), onde foram efetuados 3 protocolos diferentes para a Doença Hemorrágica Viral do coelho e 1 protocolo para a Mixomatose.

A análise estatística foi realizada utilizando os programas E-Surge e RStudio. Foram analisados os dados de 266 capturas, decorridas entre maio de 2018 e setembro de 2020. Entre as campanhas de capturas, foram adquiridos conhecimentos principalmente nas áreas de estatística e de análise de dados utilizando modelos de mistura finita e modelos multi evento captura-marcação-recaptura.

## **1.2. Revisão bibliográfica**

### **1.2.1. Coelho, a sua importância e condicionantes populacionais**

O coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus*) é o único representante do seu género e pertence à ordem Lagomorfa. Originário da parte sul da Península Ibérica, é, atualmente, uma das espécies mais disseminadas no mundo. Pode ser encontrado em todos os continentes, por se tratar de uma espécie muito adaptável a diferentes condições climáticas. O coelho bravo é um dos mamíferos invasores mais bem-sucedidos. Os seus antepassados de origem ibérica foram introduzidos em todos os continentes, exceto na Antártida, e devido à sua elevada adaptabilidade, conseguiu reproduzir-se e disseminar-se pelos continentes onde foi introduzido. Embora seja considerado uma espécie de praga noutras latitudes, desempenha um papel importante no equilíbrio na região de onde é originário (Arenas et al. 2006; Lees and Bell 2008; Ferreira 2012).

Devido à sua distribuição mundial, foi objeto de inúmeros estudos sobre a biologia da espécie e do impacto que diferentes condições ambientais tiveram esta espécie. No entanto, este lagomorfo tem as suas origens na Península Ibérica, onde duas subespécies, *O. cuniculus algirus* e *O. cuniculus*, coexistem em condições naturais (Ferreira 2012). No Mediterrâneo, o coelho bravo é considerado uma espécie com grande impacto sendo considerada ecologicamente muito importante. Contudo, noutras regiões de diferentes latitudes e em áreas onde predomina a agricultura, esta espécie é considerada uma praga, havendo necessidade de, em determinados casos, haver algum tipo de controlo (Arenas et al. 2006; Ferreira 2012).

O coelho bravo é o único lagomorfo que constrói tocas. Pensa-se que estas construções permitem ao coelho explorar a heterogeneidade ambiental e dispor de estruturas de proteção contra predadores, ao mesmo tempo que serve de abrigo face a condições climáticas extremas (Martins et al. 2002). Estas tocas podem ser identificadas nos montados do sul de Portugal onde a disponibilidade de cobertura protetora e a presença abundante de recursos alimentares permite ao coelho bravo fixar-se nestes locais. A disponibilidade de alimento e água, bem como a proteção providenciada pela vegetação são os principais fatores que determinam a localização da construção de tocas de coelho (Martins et al. 2002).

Historicamente, o coelho bravo era uma espécie muito abundante na Península Ibérica, tendo um papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas e para inúmeras outras espécies. Contudo, com o aparecimento da Mixomatose e da Doença Hemorrágica Viral houve um declínio acentuado do número total de coelhos, na ordem dos 90% (Delibes-Mateos et al. 2014; Guerrero-Casado et al. 2016).

O coelho bravo tem uma influência relevante no equilíbrio do ecossistema, sendo considerada uma espécie chave, conceito criado em 1969 pelo zoólogo Robert Trent Paine. Uma espécie chave apresenta um papel vital na estrutura, funcionamento ou produtividade da sua comunidade ou ecossistema. A sua redução acentuada ou o seu desaparecimento pode causar grandes impactos e mudanças drásticas, ou até mesmo catastróficas, levando a um desequilíbrio considerável do ecossistema onde persiste. Pode ainda ser responsável por conduzir a extinções de outras espécies dependentes desta, considerando que o coelho bravo se encontra na base da cadeia alimentar de aproximadamente 40 espécies predadoras ibéricas, incluindo, entre outras, as do lince ibérico (*Lynx pardinus*), da raposa vermelha (*Vulpes*), da águia imperial (*Aquila adalberti*). Assim, qualquer alteração significativa no número de coelhos bravo pode ter um impacto substancial na capacidade de sobrevivência ou de manutenção de outras espécies, bem como gerar um conjunto de respostas funcionais e numéricas por parte destes predadores, por vezes de forma imprevisível. O declínio acentuado e continuado das populações de coelhos afetou um grande número predadores, colocando atualmente certas espécies em risco de extinção. Os esforços realizados para manter e repor o número de populações destes predadores conduziram à implementação de medidas para a sua conservação. Neste âmbito, foram adotados planos tendentes a suplementar as populações de coelhos selvagens em declínio e a repor outras populações em áreas de onde foram erradicados (Arenas et al. 2006; Ferreras et al. 2011; Ferreira 2012; Encarnação et al. 2019).

Assume ainda particular relevância o papel desempenhado pelo coelho na flora, onde é responsável pela alteração da composição das espécies vegetais e da estrutura da vegetação através da sua ação de pastoreio e de dispersão de sementes (Delibes-Mateos et al. 2009). As suas latrinas têm efeitos benéficos na fertilidade do solo e as tocas proporcionam locais de nidificação e abrigo tanto para vertebrados como para invertebrados. Para além dos impactos anteriormente referidos no ecossistema, os coelhos têm ainda um valor económico relevante para o setor da caça, nomeadamente na Península Ibérica, onde são uma das principais espécies utilizadas nesta atividade geradora de riqueza (Delibes-Mateos et al. 2009).

Considerando que se trata de uma espécie fulcral para o equilíbrio de inúmeros ecossistemas, para a conservação da biodiversidade e para a manutenção de uma variedade de espécies, assumiu enorme importância a realização de estudos que permitiram melhor compreender os fatores-chave que influenciavam a evolução do número de populações de coelho bravo. O aparecimento de certas doenças virais, a continua perda de habitat e efeitos

antropogénicos são as principais causas que levaram a um declínio acentuado do número exemplares desta espécie (Delibes-Mateos et al. 2009).

As doenças infecciosas têm o potencial de impulsionar a evolução dos seus hospedeiros, particularmente quando introduzidas pela primeira vez numa espécie hospedeira local. Os animais que sobrevivem quando expostos a vírus, irão transmitir à sua descendência a genética responsável pela maior resistência a estes agentes infecciosos. Desta maneira, as doenças podem ser responsáveis por alterar a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas, criando novas interações bióticas e modificando as já existentes (Monterroso et al. 2016).

As principais doenças virais que afetam o coelho doméstico europeu (*Oryctolagus cuniculus*) são a Mixomatose e a Doença Hemorrágica Viral (DHV). Ambas revelaram ser responsáveis por prejudicar quer a saúde e o bem-estar do coelho, quer o equilíbrio do ecossistema onde o coelho persiste (Rosell et al. 2019). O aparecimento destas duas doenças virais associado à contínua perda do seu habitat natural conduziu a uma diminuição significativa da população de coelhos.

A primeira grande crise foi observada na década de 1950 causada pela doença Mixomatose, responsável por mortalidades a rondar os 90% (Delibes-Mateos et al. 2009).

Uma segunda crise ocorreu nos anos 80s, quando as populações de coelho bravo foram afetadas por uma nova doença viral extremamente infecciosa e letal, denominada Doença Hemorrágica Viral do coelho. Tratava-se de uma doença capaz de infetar coelhos domésticos e selvagens e originar taxas de mortalidade elevadas, entre os 55% e 75% (Delibes-Mateos et al. 2009).

O impacto causado pela Doença Hemorrágica Viral do coelho foi sentido em várias vertentes. Houve um significativo impacto a nível ecológico, quer pela diminuição abrupta do número total de coelhos, quer pelo impacto indireto causado a muitas outras espécies que dependiam do coelho para a sua sobrevivência (Ferrerias et al. 2011). O impacto económico causado pelo vírus foi igualmente observado em vários setores, nomeadamente no das indústrias de carne e de pele (Abrantes et al. 2012).

Desde os surtos iniciais, estas duas doenças tornaram-se endémicas e as taxas de mortalidade relacionadas diminuíram consideravelmente. Este decréscimo de mortalidade deriva, em grande parte, a uma maior resistência do hospedeiro aos vírus infecciosos anteriormente referidos. Contudo, as infeções causadas por estas doenças virológicas ainda desempenham um papel importante na dinâmica nas populações de coelhos (Calvete 2006).

### 1.2.2. Mixomatose

A Mixomatose é uma doença infecciosa, virulenta e contagiosa que afeta o coelho bravo, *Oryctolagus cuniculus*, causado pelo mixoma vírus, um poxvírus de género Leporipoxvírus. É transmitido principalmente por vetores, nomeadamente mosquitos ou outros artrópodes mordedores. Foi descrita pela primeira vez em 1896 no Uruguai (Bertagnoli and Marchandean 2015). Esta doença infecciosa é caracterizada pelo aparecimento de pseudotumores chamados “mixomas” nas regiões da cabeça, anogenital e dorso-lombar. Normalmente apresenta-se associada a perturbações respiratórias e blefaroconjuntivite, podendo, nos casos mais graves, levar à morte do indivíduo em dez dias (Bertagnoli and Marchandean 2015).

O vírus causador da Mixomatose é naturalmente encontrado no coelho da selva da América do Sul (*Sylvilagus brasiliensis*) ou no coelho de mato (*S. bachmani*) da América do Norte, nas quais causa apenas uma doença ligeira (fibroma cutâneo localizado). Contudo, nos coelhos europeus do género *Oryctolagus* causa uma doença letal e disseminada que pode atingir 100% de mortalidade (Best and Kerr 2000; Bertagnoli and Marchandean 2015).

A doença Mixomatose pode apresentar diferentes progressões clínicas de acordo com a virulência das estirpes virais. Fenner e Marshall (1957) descreveram um sistema que descreve a virulência de cada estirpe e as classifica de acordo com a taxa de mortalidade e o tempo médio de sobrevivência dos animais pós-infeção. Este estudo foi realizado através de animais experimentais em condições laboratoriais. De acordo com o sistema apresentado, a infeção de um coelho por Mixomatose pode ser classificada em cinco graus de gravidade. As estirpes de grau I são as mais agressivas, enquanto as estirpes de grau V são altamente atenuadas (Fenner and Marshall 1957; Bertagnoli and Marchandean 2015).

- Os graus I e II produzem formas agudas da doença, apresentando, por isso, elevadas taxas de mortalidade. O período de incubação é de 5 dias. Em 6-7 dias, começam a surgir os mixomas em três diferentes regiões: (i) na região da cabeça, com blefaroconjuntivite, inchaço edematoso, distorção do rosto (leontíase), descarga nasal purulenta; (ii) na região anogenital, acompanhado de edema regional; e (iii) na região dorso-lombar e tarsometatarsal, distorcendo a forma do dorso e quartos traseiros. Nestes dois graus, a doença Mixomatose é muito agressiva pelo que a morte ocorre 10-15 dias após a inoculação. Os mixomas normalmente tornam-se necróticos e confluentes, mas permanecem indolores. A disfunção geral do sistema imunitário agrava-se com o aparecimento de infeções secundárias bacterianas frequentes.

- As estirpes com virulência atenuada (grau V) causam infeções secundárias mais ligeiras e localizadas. Nestes casos, a doença apresenta-se principalmente com lesões



autolimitastes, que, na maioria dos casos, se curam sem necessitar de tratamento. Os coelhos apresentam pequeno número de nódulos em forma de ervilha, firmes, não exsudativos, principalmente nódulos auriculares e metatarsos.

- As estirpes de patogenicidade intermédia (graus III e IV) resultam em formas da doença entre estes dois extremos. A diferença essencial entre as estirpes europeias e australianas é o mixoma cutâneo protuberante que se verifica nas primeiras (Bertagnoli and Marchandean 2015).

Uma forma hiperaguda da doença também pode afetar os coelhos, quando estes são infectados pela estirpe californiana do vírus do mixoma. Nestes casos, a Mixomatose apresenta uma taxa de mortalidade muito elevada, ocorrendo a morte do indivíduo em aproximadamente uma semana. Os coelhos infectados apresentam apenas pequenos sinais clínicos externos, tais como inflamação e edema das pálpebras. A hemorragia cutânea pode ser vista numa fase final da doença e, muitas vezes, a morte é precedida de convulsões. Frequentemente, identificam-se infeções secundárias bacterianas no trato respiratório e na conjuntiva com bactérias Gram-negativas, especialmente *Pasteurella multocida* e *Bordetella bronchiseptica*, que contribuem para o aumento da letalidade da doença (Bertagnoli and Marchandean 2015).

Tal como referido anteriormente, o coelho bravo apresenta uma distribuição mundial, apesar de em certas áreas geográficas ser considerado uma praga, originando que, em determinadas situações, seja necessário adotar medidas mais drásticas para controlar as suas populações. O coelho bravo, *Oryctolagus cuniculus*, é uma das espécies de vertebrados mais prejudiciais nos ecossistemas nativos e áreas agrícolas da Austrália. Desde as primeiras grandes libertações de coelhos ocorridas na Austrália continental em 1859 (Peacock and Abbott 2013), que estes foram responsáveis por grandes danos ambientais e económicos através do pastoreio em plantas nativas, competindo com herbívoros nativos, e degradando terras agrícolas. Numa tentativa de controlo biológico, o altamente virulento vírus do mixoma, originalmente isolado no Brasil, foi deliberadamente introduzido na Austrália em 1950. Os resultados obtidos com esta experiência excederam as expectativas. Após a sua introdução, o vírus alastrou a todo o continente, reduzindo drasticamente o número de coelhos e tornando-se endémico na sua população (Kerr 2012). Em 1952, o vírus da Mixomatose foi introduzido ilegalmente em França por um agricultor/latifundiário com o intuito de erradicar a espécie da sua propriedade, tendo, a partir deste momento, a doença alastrada rapidamente pelo resto da Europa (Best and Kerr 2000; Kerr 2012; Bertagnoli and Marchandean 2015).

Este vírus foi inicialmente responsável por mortalidades entre 90% a 99% dos coelhos infectados. Contudo, houve uma seleção rápida para variantes menos virulentas do vírus de

Mixomatose, que associado a uma maior resistência dos coelhos ao vírus levou a que houvesse um aumento da taxa de sobrevivência desta espécie à Mixomatose. Os coelhos infectados com estas novas estirpes menos agressivas apresentavam um maior tempo de sobrevivência pós-infecção apesar da taxa de mortalidade continuar a apresentar valores elevados (Fenner and Marshall 1957; Kerr 2012).

A introdução desta nova variante de vírus mixoma mais patogénico conduziu a uma seleção natural de coelhos com maior resistência inata ao vírus causador de Mixomatose. Estes coelhos resistentes à doença rapidamente passaram a dominar as populações de coelhos na Austrália. Como consequência, a taxa de sobrevivência aumentou consideravelmente de valores que rondavam os 10% para 74%, nos 7 anos após a primeira epidemia de Mixomatose (Marshall and Fenner 1958). Um padrão semelhante de coevolução do vírus e do hospedeiro foi observado após o aparecimento do vírus da Mixomatose na Europa (Fenner and Ross 1994).

Atualmente, mais de 60 anos após a sua introdução na Europa e na Austrália, a Mixomatose tornou-se enzoótica, podendo, no entanto, apresentar ligeiras epizootias regionais e sazonais. Para além das formas agudas, responsáveis por elevadas taxas de letalidade, novas formas subagudas e atenuadas surgiram ao longo dos anos com maiores taxas de sobrevivência e capazes de conferir imunidade ao coelho. No entanto, a Mixomatose continua a ser uma das principais causas de morte em coelhos selvagens, contribuindo para o declínio acentuado das suas populações registado na Europa ao longo dos últimos 30 anos (Bertagnoli and Marchandeu 2015).

### **1.2.3. Doença – DHV estirpe original**

O primeiro surto da Doença Hemorrágica Viral foi descrito na província Jiangsu, na China, numa população de coelhos importados da Alemanha. No período de um ano, esta doença viral já teria sido responsável pela morte de aproximadamente 140 milhões de coelhos domésticos (Abrantes et al. 2012). Foi reportada na Europa pela primeira vez, na Itália, em 1986, e rapidamente se espalhou pelo continente europeu, tornando-se endémica em inúmeros países. Na Península Ibérica, onde o coelho bravo é originário, os primeiros surtos foram detetados em 1988 e 1989, em Espanha e em Portugal, respetivamente. Esta doença levou a uma rápida diminuição do número total desta espécie. No final da década de 80 e durante os anos 90, este vírus propagou-se a nível mundial, particularmente no Norte de África e na América. Atualmente, o México foi o único país que efetivamente que foi capaz de ter sucesso na erradicação desta doença, tendo o último surto ocorrido em 1992 (Abrantes et al. 2012).

Existem estudos que parecem indicar que em regiões em que, historicamente, o coelho bravo se apresentava maioritariamente em populações selvagens, a DHV se classifica como uma doença endémica na respetiva área. Em oposição, em regiões onde esta espécie é maioritariamente apresentada como doméstica ou industrial, a ocorrência da DHV ocorre em forma de surtos esporádicos. Neste caso, a quantidade e intensidade de casos apresentam uma correlação positiva com a densidade de coelhos numa determinada área (Abrantes et al. 2012).

Com o surgimento deste vírus, e devido ao enorme impacto económico e ecológico causado por este, houve necessidade de promover um grande número de estudos e investigações com o objetivo de o classificar.

O vírus da doença hemorrágica do coelho é um lagovírus da Família Caliciviridae que afeta primariamente o fígado, os pulmões e o baço. O período de incubação desta doença varia entre 1 a 3 dias, nos quais o animal vai desenvolvendo uma febre progressiva acabando por sucumbir quando atinge temperaturas acima dos 40°C durante 12 a 36 horas. Dependendo da evolução clínica da doença, três diferentes cursos clínicos podem ocorrer, hiperagudo, agudo ou crónico. Se o indivíduo apresentar uma evolução hiperaguda, este não irá apresentar nenhum sinal clínico e morre subitamente da doença. Nos outros dois cursos clínicos, o animal irá apresentar sintomatologia.

Numa evolução aguda da doença, o animal apresenta uma infeção que é acompanhada de anorexia, apatia e congestão da conjuntiva palpebral. Poderá também apresentar sintomatologia neurológica, tais como excitação, paralisia e ataxia, e, ocasionalmente pode ocorrer alguma sintomatologia respiratória (traqueíte, dispneia e cianose), descargas nasais espumosas e sangrentas, lacrimejamento, hemorragias oculares e epistaxe (Abrantes et al. 2012).

Relativamente à forma como a doença se manifesta, nomeadamente à sintomatologia clínica apresentada, as evoluções subagudas não diferem muito da evolução aguda descrita anteriormente. Contudo, os sintomas apresentados são mais ligeiros e a mortalidade é consideravelmente menor, com taxas de sobrevivência maiores. Nestes casos, os coelhos desenvolvem anticorpos contra a DHV, dispondo de uma proteção eficaz contra uma possível reinfeção (Abrantes et al. 2012).

Durante surtos de Doença Hemorrágica Viral, foi relatado que apenas uma pequena percentagem de coelhos apresenta uma forma crónica da doença. Nestes casos, os animais infetados apresentam, como sintomatologia, icterícia grave e generalizada, anorexia e letargia. Nestes coelhos habitualmente a morte ocorre entre 1 a 2 semanas após infeção. No

entanto, aqueles que sobrevivem e superam a doença apresentam uma forte seroconversão (Abrantes et al. 2012).

O vírus da Doença Hemorrágica Viral afeta um vasto número de órgãos, sendo o fígado, o pulmão e o baço os principais tecidos alvo. As principais lesões histopatológicas encontradas na necropsia são hepatite aguda (devido à perda de células hepáticas como resultado da apoptose induzida pela DHV) e a esplenomegalia (Abrantes et al. 2012). Hemorragias e congestão podem ser observadas em vários órgãos, particularmente nos pulmões, coração e rins, como resultado de uma coagulação intravascular disseminada maciça. Esta é geralmente a causa de morte em coelhos que apresentem este tipo de lesão. Com a progressão da doença verifica-se um comprometimento da resposta imunitária causado por um esgotamento dos linfócitos B e T no fígado e no baço. Esta depleção de linfócitos conduz a uma progressão fatal da doença entre 2 a 3 dias. Em contraste, os coelhos que resistem ao vírus desenvolvem títulos elevados de imunoglobulina (Ig) M (numa fase seguinte apresentam contagens elevadas de IgA e IgG) a partir no terceiro dia pós-infecção, apresentando assim uma resposta imunitária humoral eficaz. A IgM é a primeira classe de anticorpos produzidos após a ativação das células B, subtipo de linfócito que constitui o sistema imunitário, apresentando um importante papel na imunidade humoral. A IgM, juntamente com a IgA, desempenha um papel crítico no sistema imunitário (Abrantes et al. 2012; Li et al. 2020).

O aparecimento da Doença Hemorrágica Viral do coelho, tal como anteriormente referido, conduziu a uma redução significativa do número total de populações de coelho bravo. Esta diminuição foi responsável por causar inúmeros efeitos negativos que foram sentidos em setores económicos, tais como, os de carne e pele, e também ambientais, noutras espécies e ecossistemas. Após os surtos iniciais, a Doença Hemorrágica Viral do coelho tornou-se uma doença endémica, tendo-se registado uma diminuição considerável das taxas de mortalidade associadas a esta doença (Calvete 2006; Ferreras et al. 2011).

#### **1.2.4. Doença – DHV nova estirpe**

Neste estudo, iremos utilizar a nomenclatura proposta por Jacques Le Pendu (2017), que se baseia em agrupar os diferentes grupos de lagovírus com base em critérios filogenéticos. A variante clássica, irá ser referida como GI.1, enquanto que a nova variante irá ser referenciada como GI.2.

Recentemente, foi identificada uma nova variante, GI.2, do vírus da Doença Hemorrágica Viral do coelho, responsável por causar uma elevada taxa de mortalidade, de

cerca de 90%. Este novo vírus pode afetar coelhos jovens e populações vacinadas contra a primeira variante do vírus (Guerrero-Casado et al. 2016).

Em agosto de 2010, foi reportado um caso atípico de DHV numa população de coelhos domésticos no norte de França. Neste surto, foi observada uma grande taxa de mortalidade em coelhos não vacinados contra o vírus da Doença Hemorrágica Viral e uma mortalidade a rondar os 25% em coelhos vacinados. Durante este período, inúmeros casos foram igualmente relatados na mesma área. As amostras recolhidas revelaram a presença de um vírus geneticamente relacionado com o da Doença Hemorrágica Viral, que, contudo, apresentava alterações significativas. Estas diferenças foram observadas sobretudo em termos de posição filogenética, perfil antigénico e patogenicidade. Após vários casos atípicos de DHV terem sido relatados com origem em França, a variante GI.2 foi pela primeira vez descrita em Itália, numa exploração animal industrial na província de Udine (Le Gall-Reculé et al. 2011; Le Gall-Reculé et al. 2013). Desde os primeiros surtos esta variante propagou-se rapidamente pelos restantes países europeus, substituindo as que circulavam anteriormente, nomeadamente as da variante GI.1 da Doença Hemorrágica Viral (Le Gall-Reculé et al. 2013).

Em Portugal, a variante GI.2 foi descrita pela primeira vez em 2012, sendo responsável por surtos graves de doença hemorrágica em coelhos selvagens, entre 2013 e 2014. Tal como ocorrido nos restantes países europeus, o aparecimento da GI.2 originou um grande declínio do número de populações de coelho selvagem. À semelhança do sucedido, noutros locais onde a DHV era endémica, a nova variante rapidamente substituiu as antigas, tornando-se a principal causadora de doença hemorrágica (Lopes et al. 2015).

O aparecimento desta nova variante de Doença Hemorrágica Viral teve graves impactos negativos indiretos principalmente em dois predadores, o lince ibérico e a águia imperial ibérica. O coelho constitui uma importante fonte de alimento para estas duas espécies, tendo, após a chegada da DHV2, registado um acentuado declínio do número de populações de coelho, que originou um forte impacto ao longo da cadeia alimentar. Estes predadores responderam à chegada de DHV2 com a diminuição da fecundidade, que foi anteriormente observada após o primeiro surto de Doença Hemorrágica Viral na década de 1990. O impacto negativo da DHV2 nas populações de lince ibérico foi mais elevado quando comparado com aquele que fora causado pela variante da Doença Hemorrágica Viral clássica (Monterroso et al. 2016).

Os primeiros estudos realizados em França afirmavam que a progressão e as características clínicas da doença induzida pela nova variante do vírus aparentavam ser bastante diferentes das descritas na doença hemorrágica clássica. Estas diferem sobretudo em termos de duração da doença, taxas de letalidade e ocorrência de formas subagudas

/crónicas, que são, na maioria dos casos mais frequentes (Le Gall-Reculé et al. 2013). Em estudos mais recentes demonstrou-se, contudo, que ambas variantes causavam formas agudas de DHV e que o tempo médio de vida até à morte no pós-infeção é semelhante, exceto para coelhos com menos de 8 semanas infetados com a primeira variante. Os sinais clínicos e lesões eram também análogos, incluindo esplenomegalia. Esta lesão esplénica dependia do tempo até à morte do animal infetado, mas não do tipo de vírus inoculado (Calvete et al. 2018).

A proteção limitada conferida pelas vacinas comerciais, bem como a mortalidade observada em coelhos infetados com a GI.2 quando comparada com a GI.1, revela que a proteção cruzada entre as duas variantes é parcial e ineficaz (Le Gall-Reculé et al. 2013). As taxas de letalidade causadas pela nova variante em coelhos vacinados contra a GI.1 indicam uma proteção limitada por parte dos anticorpos obtidos pela vacinação na proteção contra a Doença Hemorrágica Viral. Coelhos previamente infetados com a GI.1 e, por isso, apresentando anticorpos contra esta, podem igualmente ser infetados com GI.2 e morrer. Estes dados comprovam que a proteção cruzada entre estas duas estirpes de vírus causadores de Doença Hemorrágica Viral no coelho é fraca e não suficiente para conferir uma adequada proteção (Calvete et al. 2018).

Nas populações de coelhos selvagens, pode ser difícil identificar sinais clínicos ou a progressão de algumas doenças, pelo que assume particular importância a monitorização frequente destas populações a fim de compreender a epidemiologia deste novo vírus e criar novas abordagens de gestão e conservação (Guerrero-Casado et al. 2016; Rouco et al. 2018).

### **1.2.5. Estado atual do coelho como espécie protegida**

Desde 1950, foi observada uma redução muito acentuada das densidades populacionais de coelho bravo para valores inferiores a 10%, quando comparado com as observadas no início desse mesmo século. Este declínio, causado pelo aparecimento das doenças virais referidas anteriormente, por uma continua perda de habitat, predação e por efeitos antropogénicos, levou a que o coelho bravo fosse considerado uma espécie vulnerável em Espanha e quase ameaçada em Portugal (Villafuerte and Delibes-Mateos 2019). Nos anos que se seguiram a esta categorização, continuou a verificar-se uma decadência progressiva do coelho no seu habitat natural.

Desde 2010, com o aparecimento da variante GI.2 do vírus da Doença Hemorrágica Viral, foi observado um novo declínio da população de coelhos europeus, estimado entre 60-70%, na última década. Como consequência, esta situação trouxe um forte impacto na

evolução de outras espécies, nomeadamente as do lince ibérico (diminuição de 65,7% no número de populações) e da águia imperial ibérica (diminuição de 45,5% na fecundidade). Atualmente, e em resultado do seu declínio progressivo, o coelho bravo foi classificado como uma espécie ameaçada a nível mundial pela UICN (União Internacional para a Conservação da Natureza) (Villafuerte and Delibes-Mateos 2019).

O declínio acentuado observado no número de coelhos bravo associado à sua classificação como espécie ameaçada levou a que novos esforços de conservação desta espécie fossem realizados. Foram delineadas e identificadas medidas específicas necessárias para controlar o declínio verificado e permitir a recuperação do coelho, nomeadamente (Villafuerte and Delibes-Mateos 2019):

- Estabelecer programas de monitorização desta espécie de forma a detetar e descrever as causas que levam à diminuição do número de populações de coelho bravo;

- Criar e implementar um plano de recuperação que permita dar prioridade à recuperação e manutenção das populações críticas, isto é, às que estão em maior risco de extinção. Estes planos já foram implementados anteriormente, mas o seu principal objetivo era o da conservação de outras espécies predadoras, nomeadamente a águia imperial espanhola e o lince ibérico;

- Criar programas com o objetivo de limitar a incidência e o impacto de potenciais novas doenças e controlar as já existentes. Em ambientes não controlados como se verifica na natureza, existem vários obstáculos tornando o controlo de doenças mais complexo. A vacinação em massa em animais e populações selvagens é desafiante e em muitos casos inalcançável, nomeadamente quando o número de indivíduos necessário vacinar é tão elevado como aquele que se verifica nas populações de coelho bravo. Além disso, as vacinas presentes no mercado não conferem imunidade total quer à DHV, quer à Mixomatose (Rosell et al. 2019);

- O impacto da redução da caça não aparenta ser o suficiente para permitir alterações significativas no declínio do número de coelhos principalmente por duas razões. Primeiro porque o impacto negativo verificado é causado pelas doenças infecciosas acima referidas ultrapassa largamente o impacto causado pela caça. Segundo, porque na Península Ibérica, a caça é uma atividade predominante pelo que se verifica uma boa gestão com estratégias eficazes para aumentar o número de populações de coelho;

- Em áreas onde a agricultura predomina, o coelho é considerado uma praga e é responsável por causar prejuízos. A sensibilização dos agricultores e caçadores para as questões de conservação dos coelhos é geralmente baixa. Torna-se assim necessário

desenvolver planos de apoio financeiro em casos de danos causados pelos coelhos, de maneira a mitigar as tentativas de redução de populações de coelho por parte dos agricultores e caçadores, principalmente em áreas onde o coelho assume particular relevância como sendo uma espécie com um papel ecológico importante;

- Controlar e minimizar a perda de habitat naturais dos coelhos e criar programas de recuperação de áreas onde anteriormente o coelho existia em abundância;

- Criar novos programas de reintrodução do coelho e melhorar aqueles já existentes. Verifica-se que, estes esforços não têm conseguido aumentar o número de populações existentes principalmente devido a uma seleção desapropriada do número de animais a libertar e a um aumento da mortalidade por predação e propagação de doenças. Apesar disto, estes programas têm conseguido sustentar alguns predadores (que com o declínio de coelhos, muitos ficaram em risco de extinção) e certas populações de animais destinados à caça;

- Criar medidas de controlo de predadores. Apesar de não serem a causa do declínio verificado nas populações de coelho, muitas vezes os predadores são responsáveis por impedir um repovoamento em situações de reintrodução de populações de coelho. Assim sendo, é essencial haver um bom controlo de espécies predadoras que influenciam negativamente a evolução do número de coelhos.

O coelho bravo é uma espécie ecologicamente muito importante pelo que a sua redução em número significativo desencadeou uma série de repercussões que foram e são sentidas no equilíbrio dos ecossistemas e da biodiversidade. Implementar e cumprir as medidas acima referidas é crucial para a recuperação desta espécie. É igualmente importante compreender a epidemiologia das doenças infecciosas que influenciam a variação do número total de populações de coelhos. Este conjunto de medidas e os estudos realizados permitem compreender e decidir sobre qual é o caminho a seguir, tendo em vista alcançar a recuperação desta importante espécie.

#### **1.2.6. Modelos estatísticos – importância em estudos de vida selvagem**

Todos os anos, surgem vários novos agentes infecciosos que constituem grandes ameaças à conservação da biodiversidade, com impacto negativo na saúde pública e na produção alimentar, sendo responsáveis ainda por graves prejuízos económicos (Daszak et al. 2000). Grande parte destes agentes infecciosos emergentes têm a sua origem em espécies selvagens (Taylor et al. 2001), alguns dos quais podem ainda ter características zoonóticas, isto é, serem transmissíveis ao ser humano, constituindo, desta forma, um risco para a saúde



pública. O aparecimento do vírus SARS-CoV2 em 2019, proveniente, provavelmente, de um quiróptero é um exemplo que realça a importância do estudo das doenças infecciosas na vida selvagem, não só pelo seu impacto na conservação destas espécies, mas também na saúde pública (Andersen et al. 2020).

Com o aparecimento regular de novas doenças, o desenvolvimento de medidas de monitorização e controlo assume um papel fundamental para limitar os impactos negativos destas. A ecologia das doenças é, assim, uma disciplina fundamental para melhor compreender os fatores de persistência das doenças infecciosas e as repercussões destas nas espécies hospedeiras suscetíveis. Estes estudos permitem delinear planos de combate às doenças já endémicas e a outras novas capazes de causar pandemias com graves consequências para a saúde pública (Engering et al. 2013). A compreensão das dinâmicas das populações presentes num ecossistema, bem como as suas interações com os agentes infecciosos é fulcral para a construção das medidas de combate a epidemias/pandemias. Estas dependem diretamente da análise de estudos sobre os parâmetros epidemiológicos da população alvo ao longo de um determinado período de tempo.

Existem dois tipos possíveis de estudos que podem ser implementados na investigação do impacto de doenças infecciosas em populações na natureza, estudos transversais e longitudinais. Contudo, a grande maioria dos conhecimentos obtidos sobre ecologia da doença na fauna selvagem foi alcançada a partir de estudos transversais de agentes patogénicos. Ambos podem apresentar vantagens de acordo com o objetivo do ensaio realizado pelo que delinear corretamente o plano do estudo, assume um papel relevante e decisivo para se alcançar os objetivos traçados. Os desenhos de estudos transversais são utilizados para analisar certos dados num determinado momento específico, não contemplando e interpretando quaisquer dados obtidos fora do intervalo de tempo delimitado para a análise estatística quer antes, quer depois. Estes estudos apresentam a vantagem de serem consideravelmente fáceis de implementar nos modelos epidemiológicos e de gerarem resultados rápidos. No entanto, apenas fornecem provas de associação entre diferentes fatores e resultados de doenças. Por outro lado, os estudos longitudinais podem abordar a causalidade, fornecendo uma ligação temporal entre determinantes e resultados de doenças. Estes analisam a amostra pretendida ao longo de um determinado período de tempo, permitindo obter resultados e conclusões que estudos transversais não conseguem. Ambos os diferentes estudos descritos apresentam vantagens e desvantagens pelo que a escolha do mais indicado depende do objetivo do ensaio realizado (Jennelle et al. 2007; Gilbert et al. 2013).

A vigilância longitudinal das doenças da fauna selvagem pode apresentar alguns obstáculos, nomeadamente na identificação de cada indivíduo incluído no ensaio realizado. Estes problemas podem ser superados utilizando dados obtidos de estudos de captura-marcação-recaptura (CMR). Estes estudos, através de uma monitorização individual, produzem dados que permitem desenhar a história de cada indivíduo e obter resultados ao longo de um período de tempo. No momento de primeiro contacto com cada indivíduo, este é capturado e marcado com sistemas de marcação individual e de seguida libertado no seu ambiente natural. A marcação nesta primeira interação é feita utilizando dispositivos como microchips ou etiquetas ou através de registo de marcas individuais naturais como por exemplo, o padrão de cor ou cicatrizes visíveis. Estes estudos são compostos normalmente por várias campanhas de captura, onde são realizadas a observação de animais já identificados e marcação de novos indivíduos capturados, a recolha de amostras (caso seja necessário para o tipo de ensaio realizado) e o registo dos dados observados. Os dados obtidos permitem construir um histórico de encontros para cada indivíduo capturado e a análise destes dados permite estimar uma variedade de parâmetros fundamentais para compreender as dinâmicas das populações em estudo (Lebreton et al. 1992).

Para analisar o impacto de uma doença num dado ecossistema, na ecologia e conservação de uma ou várias espécies, é necessário conhecer a sua prevalência, a forma de propagação e como ela atua fisiologicamente no animal infetado. O estado de infeção de um animal é determinado utilizando testes de diagnóstico específicos para a doença em causa. Nos estudos sobre a vida selvagem, as deteções imperfeitas e mistas são frequentes e podem criar resultados irrealistas quando este fator não é tido em consideração. É comum haver um certo grau de incerteza quando se pretende determinar a prevalência de doenças em populações, as classes genéticas, os hábitos de criação e outros parâmetros característicos intrínsecos ou comportamentais (Jennelle et al. 2007; Genovart et al. 2012). A incerteza resulta de uma deteção imperfeita ou apenas parcial ou de uma atribuição incorreta de estado de infeção, por exemplo devido, a testes de diagnóstico pouco eficazes.

Assim os estudos baseados em CMR, apesar de inicialmente terem sido desenvolvidos para estimar parâmetros demográficos na ecologia das populações, apresentam hoje um vasto leque de funcionalidades que permitem ultrapassar os desafios impostos pela falta de um ambiente controlado e estimar parâmetros eco-epidemiológicos em populações selvagens (Lebreton et al. 1992). São usados para se estudar a evolução e a interação dos agentes infecciosos nos ecossistemas e como estas influenciam as populações que coexistem neles, contribuindo para o desenvolvimento e planeamento de medidas de conservação.

Os dados recolhidos através de campanhas CMR relativos a cada indivíduo são compostos por uma série de eventos, cada um correspondente a uma ocasião de amostragem, e registado num histórico de encontros. Os dados podem ser analisados e estudados utilizando modelos multi-eventos (MECMR), que consideram estados e observações geradas a partir do estado subjacente de um indivíduo. Apresentam a vantagem de se tratarem de modelos que incluem e englobam a incerteza associada aquando da atribuição do estado, fator fundamental em estudos de vida selvagem. Os estados em que cada animal se encontra, na maioria dos casos, não são observados em campo, pelo que os valores calculados são estimados baseando-se em probabilidades de cada evento observável (Pradel, 2005).

Ao contabilizarem a incerteza, associada aquando da atribuição do estado, os MECMR otimizam a precisão dos resultados obtidos (Genovart et al. 2012; Benhaeim et al. 2018) e podem ser usados para fazer a monitorização e a análise de risco (Jennelle et al. 2007; McClintock et al. 2010).

Os modelos MECMR permitem assim estimar parâmetros eco-epidemiológicos e incerteza associada, relacionados com taxas de infeção, de sobrevivência ou de letalidade, fatores que possam influenciar a reprodução, padrões de migração e as suas causas. Servem ainda para estudar e classificar os testes de diagnóstico utilizados calculando os valores métricos de desempenho de diagnóstico, Sensibilidade e Especificidade, não dependendo para isso de um teste de referência ou de amostras de estado de infeção conhecido (Benhaeim et al. 2018; Devineau et al. 2006; Jennelle et al. 2007; Rossi et al. 2011).

Os testes serológicos, detetando no soro anticorpos específicos para determinada doença, permitem determinar possíveis infeções ativas ou ocorridas no passado, construindo um histórico de infeções na população alvo do estudo. Na utilização de testes de diagnóstico quantitativos, existe um ponto de corte usado para distinguir amostras positivas e negativas. Se for usado um ponto de corte não ideal, certos indivíduos irão ser classificados incorretamente, contribuindo para uma estimativa errada de alguns parâmetros, como seja a prevalência da doença. O desempenho diagnóstico pode ainda ser afetado por reatividade cruzada com anticorpos não específicos presentes no sangue ou quando o agente patogénico em estudo é recente e não se conhece a eficiência dos testes serológicos utilizados (Gilbert et al. 2013; Peel et al. 2013). Há dois termos estatísticos principais que são utilizados para medir o desempenho do teste, Sensibilidade (Se) e Especificidade (Sp), cujos valores são, normalmente, expressos em percentagem. Sensibilidade quantifica a probabilidade de um indivíduo ter um resultado "positivo" quando o animal tem a doença. Especificidade mede a probabilidade de obter um resultado "negativo" quando o animal é de facto negativo. Assim,

um teste de diagnóstico ideal apresentaria valores na ordem dos 100% tanto em termos de Sensibilidade, como de Especificidade, apesar de não existirem muitos testes com estes resultados. Estimar as percentagens destas duas medidas estatísticas revela-se determinante para compreender a eficiência do teste, bem como a epidemiologia da doença (Florkowski 2008; Sharma et al. 2009), no entanto, elas raramente estão disponíveis para testes de diagnóstico em animais selvagens, particularmente quando se trata de novos agentes patogénicos ou de novas espécies hospedeiras (Peel et al. 2013), uma vez que criar um método de referência eficaz, produzir um controlo positivo e negativo, determinando o valor de corte ótimo, bem como estimar a Sensibilidade e Especificidade do teste pode apresentar inúmeros desafios (Baughman et al. 2006).

Em alternativa a este trabalho de validação, foram desenvolvidos métodos para estimar o desempenho de um determinado teste, tais como os modelos de classe latente e modelos de mistura finita. Estes métodos têm a vantagem de não dependerem de testes de referência ou de amostras (Parker et al. 1990; Peel et al. 2013). Um modelo de variável latente é um modelo estatístico que correlaciona um conjunto de variáveis observáveis com um conjunto de variáveis latentes (variáveis que não são diretamente observadas, mas que são inferidas de outras variáveis observadas). Os modelos de mistura finita permitem caracterizar as distribuições dos subgrupos seropositivos e seronegativos dentro de conjuntos de dados bimodais (Benaglia et al. 2009). Em análises estatísticas, uma distribuição bimodal é uma distribuição de probabilidade contínua onde existem duas modas diferentes. Desta forma, estes modelos podem ser utilizados como uma ferramenta para estimar a probabilidade de certa amostra ser positiva ou negativa a um teste serológico, sob uma abordagem de diagnóstico probabilístico (Parker et al. 1990; Meyer et al. 2018). Estes modelos têm sido, cada vez mais, utilizados em estudos de doenças humanas (Ades et al. 2017; Migchelsen et al. 2017) e animais (Baughman et al. 2006; Deng et al. 2016). São particularmente relevantes para a ecologia das doenças na fauna selvagem, onde raramente se encontram disponíveis amostras de estado de infeção conhecido e permitem ultrapassar os obstáculos decorrentes da incerteza associada à falta de testes validados e de amostras de referência (Peel et al. 2013).

## **II – UTILIZAÇÃO DE MODELOS MULTI EVENTO CMR PARA DETERMINAR PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS E O DESEMPENHO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICOS**

### **2.1. Objetivos**

Pretende-se, através deste estudo, demonstrar que os modelos MECMR podem estimar de forma fiável o desempenho diagnóstico dos testes serológicos e permitir comparar diferentes testes, através da contabilização da incerteza na atribuição de estados. Avaliou-se esta hipótese utilizando dados serológicos longitudinais do vírus da Doença Hemorrágica do coelho (DHV) e do vírus da doença Mixomatose em duas populações da subespécie do sudoeste ibérico do coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus algirus*).

### **2.2. Materiais e métodos**

#### **2.2.1. Trabalho de campo**

##### **2.2.1.1. Área de estudo:**

O desenho de estudo é de tipo coorte longitudinal prospetivo, isto é, trata-se de um estudo montado no presente para o futuro, procurando a partir da causa concluir os efeitos. Por se tratar de um estudo longitudinal, este visa analisar as variações observadas nas características dos mesmos indivíduos ao longo de um determinado período de tempo. Neste estudo foi envolvida a captura de coelhos bravos, marcação individual e recolha de amostras biológicas, a sua libertação e posterior recaptura.

Este estudo foi conduzido em dois locais no Sul de Portugal: uma população em liberdade na Companhia das Lezírias (CL - 38°50'43.7"N, 8°51'48.7"W) e uma população confinada num recinto de 4 hectares em Noudar (ND - 38°11'03.7 "N, 7°02'24.4 "W). A paisagem em ambos os locais de estudo consiste num mosaico de mato (principalmente *Cistus* sp, *Lavandula* sp e *Ulex* sp) pouco arborizado com sobreiro (*Quercus suber*) no CL e azinho (*Quercus ilex*) no ND. Nenhuma das população em estudo se encontra sujeita à caça, contudo na CL não existe qualquer tipo de gestão e controlo contra predadores. Em oposição, em ND, a água e a ração comercial são fornecidas *ad libitum* durante todo o ano e a predação por carnívoros terrestres é impedida por uma cerca de 2 metros de altura com fio elétrico.

Na Companhia das Lezírias, as armadilhas (n=52) foram colocadas regularmente espaçadas numa área de aproximadamente 13 hectares. No Noudar, 15 armadilhas foram dispostas perto dos 4 locais de alimentação no interior do recinto vedado. A captura do coelho bravo foi efetuada com caixas armadilhas *Tomahawk* com isco de tipo alimentar. As armadilhas foram colocadas aproximadamente 2 horas antes do pôr-do-sol, alimentadas com

vegetais, e controladas aproximadamente 2 horas após o pôr-do-sol e novamente 1 hora após o nascer do sol. Durante o dia, as armadilhas eram mantidas fechadas.

Na Companhia das Lezírias, foram realizadas 11 sessões de 2-5 noites entre maio de 2018 e setembro de 2020, em que 57 coelhos foram capturados 129 vezes. No Noudar, foram realizadas 8 sessões de 2-3 noites entre julho de 2019 e setembro de 2020, nas quais 81 coelhos foram capturados 137 vezes. No local de estudo em Noudar, 33 coelhos foram retirados na primavera-verão de 2020 com o intuito de repovoar outros recintos.

Cada sessão (campanha de captura) corresponde a uma ocasião (noite de armadilhagem) no historial de captura de cada indivíduo, independentemente se houve visualização ou interação com o animal.

#### **2.2.1.2. Recolha de amostras:**

Os coelhos capturados foram marcados com um microchip subcutâneo e foram recolhidos vários dados (sexo, peso, idade, estado reprodutivo, biometrias e número de ectoparasitas) e amostras biológicas (Figura 1 e Tabela 1), para rastreio de macro e microparasitas e avaliação de parâmetros fisiológicos.



**Figura 1 – Captura e manipulação do coelho bravo: 1- contenção do coelho com auxílio de um saco de pano; 2 - microchipagem; 3 - caixa armadilha Tomahawk com isco de tipo alimentar; 4 e 5 - recolha de sangue.**

O sangue total (<0,25% do peso corporal) foi recolhido por punção da veia safena e colocado num tubo de coagulação. A amostra sanguínea recolhida foi centrifugada a 1.430 g durante 10 minutos e o soro resultante da centrifugação foi armazenado a -20 °C até à sua análise. Após manipulação e recolha de amostras, os animais eram libertados no local da sua captura.

Amostra	Contentor	Quantidade Indicada	Objetivo
Sangue	Tubo com EDTA	0,20mL <sup>(1)</sup>	Hemograma
Sangue	Tubo de coagulação	1,25-2,50mL <sup>(1)</sup>	DHV, Mixomatose (anticorpos)
Fezes	Simples	Máximo	Helmintes e protozoários gastro-intestinais
Biópsia de orelha	Tubo com álcool a 96%	1	Caracterização genética
Pêlo	Simples	2 madeixas	Medição da corticosterona
Ectoparasitas (carraças)	Simples	----	Identificar ectoparasitas
Ectoparasitas (pulgas)	Simples	----	Identificar ectoparasitas

<sup>(1)</sup> O volume total de sangue recolhido não pode ultrapassar 0,30% do peso total do animal

**Tabela 1 – Amostras recolhidas de cada coelho-bravo capturado. Para cada coelho, apenas é efetuada uma recolha de amostras por campanha de captura, independentemente do número de capturas de cada indivíduo. A biópsia de orelha apenas é recolhida na primeira captura.**

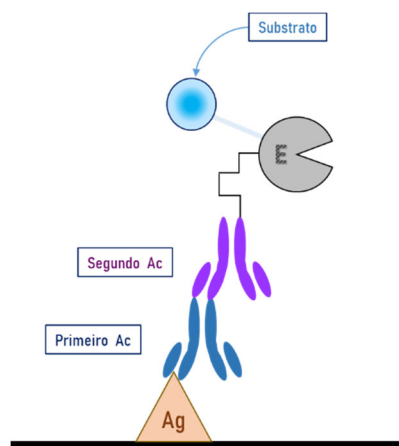
## 2.2.2. Trabalho de laboratório

Foram realizados 3 diferentes testes sorológicos de ELISA para identificar os animais positivos para a DHV e 1 teste para a Mixomatose:

- dois métodos descritos por Juan Bárcena (2015), um utilizando VPL (“*virus like particles*”) para a GI.2 e outro utilizando VPL para a GI.1;
- um kit comercial (RHDV INgezim kit) para a primeira variante, GI.1, da Doença Hemorrágica Viral do coelho.
- um kit comercial (Mixomatose INgezim kit) para a Mixomatose.

### 2.2.2.1. Métodos descritos por Juan Bárcena utilizando VPLs:

Este protocolo foi realizado duas vezes, uma utilizando VPL para a nova variante do vírus da doença hemorrágica e outra utilizando VPL para a variante original da doença.



**Figura 2 – Método de ELISA Indireto**

Estes protocolos foram realizados de acordo com Bárcena et al. (2015) e Rouco et al. (2018) com pequenas adaptações. Foi realizado um método ELISA (*“Enzyme Linked ImmunoSorbent Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”*) indireto. Este procedimento é denominado de indireto, uma vez que não é o anticorpo primário (que está no soro) que é medido, mas outro anticorpo que irá formar um complexo com o primeiro (Figura 2 e 3).

Cada poço é revestido com antígeno criando uma ligação muito estável. Isto é possível uma vez que a placa é constituída por plástico poliestireno formando uma ligação forte entre a placa e as moléculas proteicas. As partículas semelhantes a vírus derivados de GI.1- ou GI.2 (VLP) (Bárcena et al., 2015), purificadas como descrito anteriormente (Almanza et al., 2008), foram absorvidas para placas ELISA de Nunc Maxisorp 96 poços (100 ng/poço) diluídas em tampão PBS (pH 7,4) e incubadas durante a noite a 4 °C numa atmosfera controlada.

Após incubação, as placas foram lavadas com uma solução de lavagem, PBS -T 0,05% (Phosphate-buffered saline com tampão Tween), utilizando BioTek™ ELx50™ Microplate Strip Washer. De seguida, adicionou-se uma solução de bloqueio (Leite em pó sem gordura 5% em PBS autoclavado) a cada poço e as placas foram de novo incubadas durante 60 min a 37 °C numa atmosfera húmida.

Após incubação, cada placa foi lavada utilizando o mesmo programa anterior. Posteriormente, foi adicionado individualmente o soro já diluído (1:200 em solução de bloqueio) de cada indivíduo a cada poço, bem como os controlos positivos e negativos. De seguida, incubou-se durante 60 min a 37 °C numa atmosfera húmida permitindo a formação de um complexo antígeno-anticorpo. O soro para o controlo positivo foi obtido de coelhos com elevadas títulos de anticorpos contra o DHV2. O soro para o controlo negativo foi obtido a partir de soros de coelhos não vacinados sem historial de doença clínica e mantidos



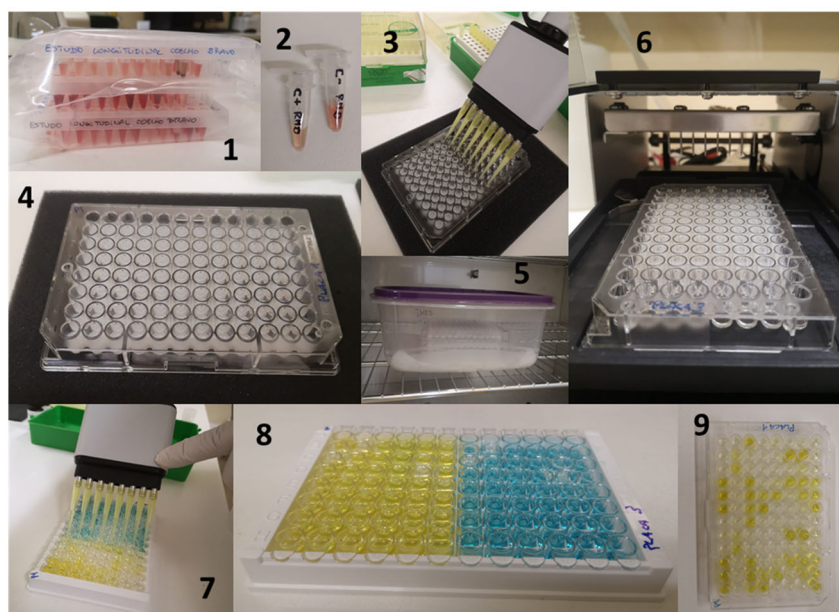
internamente, assegurando desta maneira que não teriam contactado direta ou indiretamente com a Doença Hemorrágica Viral.

Após incubação, cada placa foi lavada utilizando o mesmo programa anterior. Posteriormente, um conjugado constituído por um segundo anticorpo marcado com uma enzima é adicionado formando uma ligação com o anticorpo do soro. Este conjugado é composto por 2,5 µl Anti-coelho IgG + 10 ml Solução de bloqueio. De seguida, a incubação durante 60 min a 37 °C numa atmosfera húmida e lavagem das placas, posteriormente, são repetidas.

O substrato da enzima é adicionado a cada poço e as placas são incubadas durante 5 minutos num ambiente escuro à temperatura ambiente com o objetivo de produzir cor. Por fim, uma solução de paragem de reação é adicionada (100 µl de ácido fosfórico 1M) e as placas são lidas através de um Espectrofotómetro, usado para medir a absorvância dos poços de ELISA.

A densidade ótica (OD) de cada poço foi lida a 450nm. Todas as amostras de soro, controlos positivos e negativos foram testados em duplicado. Os testes foram considerados válidos se a média de OD 450nm das duas réplicas do controlo positivo fosse superior a 5x a média de OD 450nm das duas réplicas do controlo negativo. Os resultados dos ensaios foram calculados de acordo com a equação:

$$\text{Resultado do ensaio} = \frac{(\text{amostra média de OD450nm})}{(2 \times (\text{controlo negativo médio de OD450nm}))}$$



**Figura 3 – Protocolo do método de ELISA indireto:** 1- amostras de sangue da população em estudo; 2 – controles positivo e negativo; 3 – soro diluído de cada coelho a ser adicionado a cada poço com auxílio de uma micropipeta multicanal; 4 – placa com os soros de coelho; 5 – incubação das placas a 37°C em atmosfera húmida; 6 – lavagem das placas com auxílio do aparelho BioTek™ ELx50™ Microplate Strip Washer; 7 – solução de paragem a ser administrada com auxílio de uma micropipeta multicanal; 8 – placa antes (a azul) e depois (a amarelo) de ser adicionada a solução de paragem de reação; 9 – placa após ter sido adicionada a solução de paragem.

#### 2.2.2.2. Protocolo ELISA RHDV INgezim kit

Foi também aplicado um segundo método utilizando um kit comercial, o qual utiliza igualmente uma ELISA indireta como base. Foi seguido o protocolo do INgezim RHDV (referência 17.RHD.K1), um kit comercial que teste os coelhos para a Doença Hemorrágica Viral, que pode ser seguido em:

<https://ingenasa.eurofins-technologies.com/media/4452/protocol-17rhdk1-ingezim-rabbit.pdf>

Antes do início da realização do teste, colocaram-se as placas, onde o antígeno (proteína recombinante de DHV da estirpe GI.1) se encontrava fixado, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Os soros de controlo, positivo e negativo, encontravam-se prontos a ser utilizados. Para a preparação dos soros das amostras foi diluída cada amostra na proporção de 1/200 em diluente fornecido (obtido através da diluição de 1 parte do diluente concentrado fornecido no Kit com 4 partes de água destilada).

Foi administrado 100 µl de soro de controlo positivo e 100 µl de soro de controlo negativo nos poços A1 e B1, respetivamente, e 100 µl de cada soro-amostra a cada um dos poços restantes da placa. Após este passo, a placa foi selada e incubada durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com uma solução de lavagem, PBS

-T 0,05% (Phosphate-buffered saline com tampão Tween), utilizando BioTek™ ELx50™ Microplate Strip Washer.

De seguida, foi adicionado 100 µl de conjugado (diluído na proporção 1 parte de conjugado fornecido no Kit em 100 partes de diluente fornecido) a cada poço, constituído por um segundo anticorpo marcado com uma enzima. A placa foi selada e incubada 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação, cada placa foi lavada 5 vezes utilizando o mesmo programa anterior.

Posteriormente, foi adicionado 100 µl de substrato a cada poço, e, de seguida, as placas foram conservadas durante 10 min à temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado 100 µl de solução de paragem a cada poço. A OD de cada poço foi lida a 405nm num período de 5 min após a adição da solução de paragem.

Para o teste de diagnóstico ser validado, o rácio OD (Controlo positivo) / OD (Controlo negativo) deverá ser superior a 10.

#### **2.2.2.3. Protocolo ELISA Mixomatose INgezim kit**

Foi seguido o protocolo do INgezim Mixomatose (referência 17.MIX.K1), um kit comercial que teste os coelhos para a Mixomatose que também utiliza uma ELISA indireta como base. O protocolo pode ser seguido em:

<https://ingenasa.eurofin-technologies.com/media/4245/17mixk1-protocolo-bi.pdf>.

Este protocolo é semelhante ao descrito em 2.2.2.2. (protocolo ELISA RHDV INGEZIM Kit) com as seguintes diferenças:

- as placas contêm um antigénio da Mixomatose fixado em cada poço;
- o conjugado (contendo um segundo anticorpo) não necessitou de diluição neste protocolo;
- na leitura final, no Espectrofotómetro, a OD de cada poço foi lida a 450nm;
- para o teste de diagnóstico ser validado, o rácio OD (Controlo positivo) / OD (Controlo negativo) deverá ser superior a 5.

#### **2.2.3. Modelos multi-eventos e mistura finita**

Em estudos de animais selvagens, os modelos de CMR podem ser utilizados para estudar a sobrevivência de uma dada população num determinado período de tempo. Quando o foco do estudo se baseia numa doença, os parâmetros como a prevalência, a transição entre estados de cada indivíduo e a eficácia do teste usado, podem também ser estudados usando estes modelos.

Foi apresentado um método, denominado “mistura finita”, já comprovado e utilizado em vários estudos em populações selvagens (Parker, R. A., 1990; Baughman, A. L., 2004). Este foi utilizado para definir o ponto de corte ótimo de cada teste, e a probabilidade de cada amostra ser positiva ou negativa. Os modelos multi evento foram apresentados neste trabalho como um método inovador para avaliar a eficiência dos testes utilizados.

Uma vez que foram realizados três diferentes testes para a Doença Hemorrágica Viral do coelho, foi necessário determinar qual o melhor ensaio para proceder aos restantes testes.

O primeiro passo foi determinar qual o melhor ponto de corte de cada teste realizado utilizando modelos de mistura finita, que vão ser abordados mais detalhadamente mais à frente. Seguidamente, utilizando os modelos multi-eventos, determinou-se para cada teste (no melhor ponto de corte calculado no passo anterior) os valores de Sensibilidade e Especificidade. Após determinar qual o melhor teste e o modelo mais eficiente, utiliza-se apenas esse para estimar os restantes parâmetros, como as taxas de sobrevivência e transição entre estados. Estes modelos acima utilizados vão ser descritos em passos posteriores.

Para ambas as doenças estudadas, os modelos multi-eventos e mistura finita foram estudados, otimizados e processados. Contudo, como modelo explicativo e devido à sua maior complexidade, apenas o modelo utilizado na DHV irá ser abordado (o modelo utilizado na Mixomatose poderá ser consultado no Anexo 1).

### **2.2.3.1. Modelos matemáticos multi-eventos – E-surge**

#### **a) Definição e aplicações**

Os modelos multi-eventos lidam com a incerteza associada à caracterização de estado, sendo, por isso, uma ferramenta importante para estudos em que os indivíduos transitam entre um número finito de estados (por exemplo, vivos ou mortos; positivo ou negativo a uma doença). O programa E-Surge (Choquet et al., 2009b) permite incorporar os modelos CMR, utilizando a monitorização periódica, num período de tempo definido, permitindo estabelecer uma ligação de causa-efeito com os resultados obtidos. Baseiam-se em análises do historial de captura dos indivíduos que englobam o ensaio.

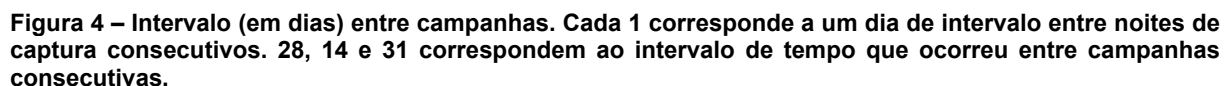
Os modelos multi-evento são definidos em termos de três diferentes tipos de parâmetros: a probabilidade de um indivíduo pertencer a cada um dos estados iniciais, as probabilidades de transições entre estados e as probabilidades associadas aos eventos. O primeiro parâmetro é utilizado para calcular a prevalência da doença na população em estudo. O segundo permite determinar as probabilidades de sobrevivência de um indivíduo, bem como as probabilidades de este transitar entre estados (por exemplo, de negativo à DHV para

positivo a esta). No último parâmetro, estão incluídas as probabilidades de libertar um animal sem este serem recolhidas amostras (por ser recaptura dentro da mesma campanha) e as probabilidades de um animal ser classificado incorretamente relativamente ao seu estado. Cada um destes parâmetros pode ser calculado utilizando matrizes pré-definidas que permitem estimar os valores pretendidos.

Os modelos foram implementados utilizando o software E-SURGE (Choquet et al., 2009b), utilizando uma abordagem de estimação por máxima verossimilhança (maximum likelihood estimation - MLE) para estimar os parâmetros. O modelo incluiu as matrizes: estado inicial, sobrevivência, transições entre estados seropositivos e seronegativos, transições entre estados de consciente e não-consciente da armadilha, probabilidade de ser testado e incerteza na atribuição de estados. A consciência da armadilha foi contabilizada através da matriz das transições entre os estados consciente da armadilha e inconsciente, que substituiu a matriz de deteção (Pradel and Sanz-Aguilar, 2012).

O ajuste (goodness-of-fit (GOF)) de um modelo estatístico descreve a qualidade de ajustamento do modelo aplicado a um determinado conjunto de observações. As medidas deste parâmetro tipicamente resumem a discrepância entre os valores observados e os valores esperados sob o modelo em questão. Uma vez que não existe nenhum teste de ajuste para dados CMR multi evento, aplicámos uma abordagem de teste GOF de estado único implementada em U-CARE, uma aplicação informática, com um conjunto de opções para a gestão de dados e capacidades de testes GOF (Choquet et al. 2009a). O teste indicou uma significativa consciência positiva da armadilha (reação positiva à captura (*trap-happiness*) nos dados recolhidos (CL:  $\chi^2 = -2,082$ ,  $P = 0,037$ , 18 df; ND:  $\chi^2 = -1,975$ ,  $P = 0,048$ , 12 df). Esta reação pode ser definida como uma correlação positiva entre as capturas, de modo que os coelhos capturados numa noite de captura têm maior probabilidade de serem capturados na noite seguinte de captura, em comparação com os coelhos que não foram capturados na noite anterior (Pradel and Sanz-Aguilar 2012).

Neste programa, foram corridos vários modelos com o intuito de determinar qual o melhor, isto é, aquele que apresentava os resultados melhor ajustados à amostra observada. Para isto analisou-se o AIC (Critério de Informação de Akaike). Quando se utilizam modelos estatísticos para analisar e processar dados, a representação do modelo não será perfeita e alguma informação poderá ser perdida durante o processo. O AIC estima a quantidade de dados perdidos pelo modelo utilizado, pelo que, quanto menos informações um modelo perde, maior a qualidade desse modelo e menor a pontuação AIC. Neste estudo, procurou-se utilizar como modelo final aquele que apresentava uma pontuação de AIC menor, de maneira, a que os parâmetros estimados apresentassem os valores mais próximos da realidade.



Os dados utilizados no programa E-surge foram obtidos nas campanhas de captura realizadas. Cada noite corresponde a uma ocasião de amostragem e é representada no historial individual do animal independentemente se houver captura ou não. Caso o indivíduo seja capturado e sejam recolhidas amostras, estas serão posteriormente processadas e analisadas utilizando os testes serológicos e os protocolos referidos anteriormente. De acordo com os valores obtidos após análise, irá ser associado um código (dependente da positividade ou não aos testes realizados) e inserido no historial individual do animal. Caso o animal não seja observado num dia de captura, este é definido como “0”. Conclui-se, desta maneira, que o historial de cada animal é composto por uma série de “0s” intercalados com valores que correspondem às noites em que o indivíduo foi capturado.

[illegible]

27

### c) Estados iniciais e eventos observáveis

Em qualquer ocasião, um coelho individual irá apresentar um dos seguintes estados iniciais: pode estar vivo nas classes A+ (positivo à doença e ciente da armadilha), U+ (positivo à doença e não ciente da armadilha), A- (negativo à doença e ciente da armadilha), U- (negativo à doença e não ciente da armadilha), ou pode estar morto (tabela 2).

Estados iniciais
DHV + a - Positivo à DHV e consciente
DHV + u - Positivo à DHV e não consciente
DHV - a - Negativo à DHV e consciente
DHV - u - Negativo à DHV e não consciente
Morto

**Tabela 2 – Estados iniciais relativos DHV**

Em cada ocasião de amostragem, as observações possíveis foram: não observado (0), seronegativo detetado (1), seropositivo detetado (2), ou detetado não testado (3). Para os modelos comparando diretamente dois ensaios serológicos, as observações possíveis foram: não observado (0), seronegativo detetado para ambos os ensaios (1), seropositivo detetado para o ensaio 1 e seronegativo para o ensaio 2 (2), seronegativo detetado para o ensaio 1 e seropositivo para o ensaio 2 (3), seropositivo detetado para ambos os ensaios (4), ou seropositivo detetado não ensaiado (5) (tabela 3).

Eventos
0 - Não capturado
1 - Negativo a ambos os testes realizados
2 - Positivo ao teste 1, mas negativo ao teste 2
3 - Positivo ao teste 2, mas negativo ao teste 1
4 - Positivo a ambos os testes realizados
5 - Capturado, mas não testado

**Tabela 3 – Eventos observáveis**

### d) Matrizes

Foram criadas matrizes sequenciais com o intuito de calcular parâmetros, como a prevalência da doença ou a sobrevivência da população entre campanhas. Estas respeitam os três tipos de parâmetros definidos pelo programa E-surge descritos anteriormente. As matrizes utilizadas neste modelo podem ser divididas em duas frações, a primeira utilizando os estados não observáveis e um segundo referente aos estados observáveis. As matrizes são sequenciais e a leitura é feita da horizontal (ocasião t) para a vertical (ocasião t+1). A horizontal de uma matriz corresponde à vertical da matriz seguinte.

Cada indivíduo pode encontrar-se num dos cinco possíveis estados não observáveis (tabela 2). No momento da primeira captura, cada coelho tem uma probabilidade  $p$  de ser positivo para a DHV e uma probabilidade complementar  $1-p$  de ser negativo à doença. Os “/” utilizados correspondem aos valores que não se pretendem estimar, apresentando uma probabilidade de ocorrência de 0. Este parâmetro, correspondente à matriz dos estados iniciais, permite estimar a prevalência da doença em estudo na população alvo (tabela 4). Numa primeira ocasião de captura, todos os coelhos são não-conscientes da armadilha, pois nunca foram capturados anteriormente (probabilidade = 0 na matriz).

Estados iniciais	DHV+ a	DHV+ u	DHV- a	DHV- u	Morto
	a	/	1-a	/	/

**Tabela 4 – Matriz dos estados iniciais.**

Os estados fisiológicos variam entre campanhas, baseando-se nas probabilidades de sobrevivência da população. O processo biológico subjacente, é representado por uma matriz que estima a probabilidade de um dado animal transitar entre estados.

Dentro da segunda etapa, são estimados 3 parâmetros, utilizando-se 3 matrizes.

- A primeira matriz permite estimar a probabilidade de um animal sobreviver entre campanhas, “b”. A probabilidade complementar, dada por “1-b”, corresponde à mortalidade entre campanhas (tabela 5).

Sobrevivência	DHV+ a	DHV+ u	DHV- a	DHV- u	Morto
DHV + a	b	/	/	/	1-b
DHV + u	/	b	/	/	1-b
DHV - a	/	/	b	/	1-b
DHV - u	/	/	/	b	1-b
Morto	/	/	/	/	1

**Tabela 5 – Matriz de sobrevivência entre campanhas**

- A segunda matriz permite estimar a probabilidade de um animal transitar entre estados entre campanhas, “c”, condicionado a ter sobrevivido (matriz anterior). A probabilidade complementar, dada por “1-c”, corresponde à probabilidade de um animal permanecer no seu estado entre campanhas (tabela 6).



<b>Transição</b>	DHV + a	DHV + u	DHV - a	DHV - u	Morto
DHV + a	1-c	/	c	/	/
DHV + u	/	1-c	/	c	/
DHV - a	c	/	1-c	/	/
DHV - u	/	c	/	1-c	/
Morto	/	/	/	/	1

**Tabela 6 – Matriz de transição entre estados entre campanhas**

- A terceira matriz permite estimar a probabilidade de um animal permanecer ou tornar-se consciente da armadilha entre campanhas, “d”. A probabilidade complementar, dada por “1-d”, corresponde à probabilidade de um animal permanecer ou tornar-se não consciente entre campanhas (tabela 7).

<b>Trap awareness/ Detecção</b>	DHV + a	DHV + u	DHV - a	DHV - u	Morto
DHV + a	d	1-d	/	/	/
DHV + u	d	1-d	/	/	/
DHV - a	/	/	d	1-d	/
DHV - u	/	/	d	1-d	/
Morto	/	/	/	/	1

**Tabela 7 – Matriz da consciência da armadilha entre campanhas**

A última etapa, correspondente aos eventos, descreve o processo de observação. Nesta etapa são estimados dois parâmetros, a probabilidade de um indivíduo ser capturado e testado e a probabilidade do estado de cada animal ser corretamente identificado pelo teste sorológico utilizado. Nas matrizes seguintes, as linhas correspondem aos estados fisiológicos e as colunas aos eventos observáveis:

- A primeira matriz permite estimar a probabilidade de um animal ser liberto sem manipulação, “e”. A probabilidade complementar, dada por “1-e”, corresponde à probabilidade de um indivíduo ser liberto com manipulação e recolha de amostras (tabela 8). Este parâmetro é estimado porque certos coelhos foram capturados mais do que uma vez na mesma campanha e não foram recolhidas amostras com um intervalo tão curto entre capturas.

<b>Testado na condição de ser capturado</b>	Não capturado	DHV + a	DHV + u	DHV - a	DHV - u	DHV não testada
DHV + a	/	1-e	/	/	/	e
DHV + u	1	/	/	/	/	/
DHV - a	/	/	/	1-e	/	e
DHV - u	1	/	/	/	/	/
Morto/ Não capturado	1	/	/	/	/	/

**Tabela 8 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser testado aquando a sua captura**

- A segunda matriz permite estimar a eficiência dos testes utilizados. “f” é a probabilidade de um indivíduo ser classificado incorretamente em pelo menos num dos testes utilizados. A probabilidade complementar, dada por “1-(soma dos f)”, corresponde à percentagem de indivíduos identificados corretamente (tabela 9). Os resultados obtidos através desta matriz vão ser utilizados para calcular os valores de Sensibilidade e Especificidade.

Observações	0	1	2	3	4	5
Não capturado	1	/	/	/	/	/
DHV + a	/	1-(soma dos f)	f	f	f	/
DHV + u	1	/	/	/	/	/
DHV - a	/	f	f	f	1-(soma dos f)	/
DHV - u	1	/	/	/	/	/
DHV não testada	/	/	/	/	/	1

**Tabela 9 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser incorretamente identificado**

No caso da Mixomatose, como apenas foi realizado um teste serológico, os valores de Sensibilidade e Especificidade são obtidos diretamente pela matriz, não necessitando de nenhum cálculo (tabela 10).

Observações	0	1	2	3
Não capturado	1	/	/	/
Mixomatose + a	/	1-f	f	/
Mixomatose + u	1	/	/	/
Mixomatose - a	/	f	1-f	f
Mixomatose - u	1	/	/	/
Mixomatose não testada	/	/	/	1

**Tabela 10 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser incorretamente identificado.**

0 – não capturado; 1 – resultado negativo ao teste de Mixomatose; 2 – resultado positivo ao teste de Mixomatose; 3 – capturado, mas não testado.

Depois de criadas as matrizes, o passo seguinte passou pela construção do modelo propriamente dito no programa E-surge utilizando dois módulos, GEPAT e GEMACO.

#### e) GEPAT

Utilizando o módulo GEPAT (GEnerator of PATtern de matrizes elementares), as matrizes acima criadas são inseridas no programa. Durante esta etapa, é necessário especificar as estruturas dos vetores de probabilidades do estado inicial, as matrizes de transições e as matrizes dos eventos que são baseados nos processos de observação (figura

1 do Anexo 1). Para especificar um parâmetro que será estimado qualquer letra pode ser utilizada. O sinal negativo “-” significa que o parâmetro correspondente a esta célula será sempre fixado em 0, enquanto que o asterisco “\*” significa o complemento da soma de todos os outros parâmetros na mesma linha.

#### **f) GEMACO**

O módulo GEMACO (GEnerator of MATrices of COstraints) permite especificar os efeitos pretendidos com as matrizes utilizadas, isto é, permite pré-definir a maneira como o programa irá interpretar os modelos introduzidos no GEPAT. Foram utilizados os seguintes códigos (figura 2 do Anexo 1):

- “f”: indica ao programa que a leitura da matriz é feita por linhas;
- “to”: indica ao programa que a leitura da matriz é feita por colunas;
- “f.to”: “from to”, significa que para cada célula de matriz é necessário ler de uma certa linha para uma certa coluna. Como exemplo explicativo, f(1).to(3) pretende calcular a probabilidade do acontecimento da linha 1 para a coluna 3;
- “t”: este código é referente a uma variação categórica ao longo do tempo. Os intervalos de tempo neste estudo não foram constantes pelo que em certas matrizes indicar variações de tempo foi fundamental. Como exemplo explicativo, .t([1:4]) faz referência aos 4 dias de duração da primeira campanha;
- “i”: este código utilizou-se para obter parâmetros com valores constantes.

Utilizando como exemplo explicativo a matriz da sobrevivência: “f(1 2).to(1 2).t([1:4; 6:9; 11:14; 16:19; 21:23; 25:28; 30:32; 34:36; 38:40; 42:44; 46:48])+f(1 2).to(1 2).t(5 10 15 20 24 29 33 37 41 45 47))+f(3 4).to(3 4).t([1:4; 6:9; 11:14; 16:19; 21:23; 25:28; 30:32; 34:36; 38:40; 42:44; 46; 48])+f(3 4).to(3 4).t(5 10 15 20 24 29 33 37 41 45 47)”. Analisando a figura 2 do Anexo 1, os primeiros quatro valores apresentados, “1”, correspondentes à primeira campanha de capturas, em código vão ser exibidos como “1:4”. De seguida, o valor “28”, correspondente ao intervalo em dias entre a primeira e a segunda campanhas, em código apresenta-se apenas como “5”. Neste código acima apresentado permite estimar 4 parâmetros:

- a sobrevivência dos animais positivos à DHV dentro de cada campanha (código utilizado - “f(1 2).to(1 2).t([1:4; 6:9; 11:14; 16:19; 21:23; 25:28; 30:32; 34:36; 38:40; 42:44; 46; 48])”). Cada intervalo de tempo (1:4, 6:9, ...) corresponde a uma campanha. Este parâmetro foi fixado em 1 no próximo passo;

- a sobrevivência dos animais positivos à DHV entre campanhas (código utilizado -  $f(1\ 2).to(1\ 2).t(5\ 10\ 15\ 20\ 24\ 29\ 33\ 37\ 41\ 45\ 47)$ ). Cada número apresentado (5, 10 ...) corresponde a um intervalo de tempo entre campanha;

- a sobrevivência dos animais negativos à DHV dentro de cada campanha (código utilizado -  $f(3\ 4).to(3\ 4).t([1:4; 6:9; 11:14; 16:19; 21:23; 25:28; 30:32; 34:36; 38:40; 42:44; 46:48])$ ). Este parâmetro foi fixado em 1 no próximo passo;

- a sobrevivência dos animais negativos à DHV entre campanhas (código utilizado -  $f(3\ 4).to(3\ 4).t(5\ 10\ 15\ 20\ 24\ 29\ 33\ 37\ 41\ 45\ 47)$ ). Cada número apresentado (5, 10 ...) corresponde a um intervalo de tempo entre campanha.

#### **g) IVFV – Valores fixados**

O último passo consiste em fixar os parâmetros pretendidos utilizando a interface IVFV (*Initial Values and Fixed Values*). Foram corridos vários modelos com o intuito de averiguar quais os valores que poderiam ser fixados de maneira a otimizar a funcionalidade do programa. Nesta etapa, os valores fixados foram os seguintes (figura 3 do Anexo 1):

- tanto a sobrevivência dos animais positivos como dos animais negativos à DHV dentro de cada campanha foi fixado como 1, significando isto que é assumido que não há mortalidade dentro de cada campanha;

- qualquer tipo de transição entre estados foram fixados em 0. Após vários modelos serem corridos e testados, verificou-se que a transição entre estados era praticamente nula;

- fixou-se a probabilidade de captura sem testar o animal para a DHV em 0,3636, correspondente à proporção de capturas em que não se colheu sangue, não havendo, por isso, resultados sorológicos;

- fixaram-se ainda dois parâmetros nos eventos em 0, referentes à identificação incorreta do coelho como positivo ou negativo, por terem sido estimados, em modelos anteriores, como aproximadamente nulos.

Após as matrizes estarem devidamente inseridas no GEPAT, os códigos corretamente aplicados no GEMACO e os valores fixados no IVFV, o modelo está apto para ser corrido. Para cada ponto de corte, foi corrido um modelo de maneira a averiguar qual o que otimizava os resultados do teste.

#### **2.2.3.2. Modelos de mistura finita**

Este segundo método foi utilizado com o propósito de averiguar a eficácia do método descrito acima em calcular eficientemente a Sensibilidade e a Especificidade dos testes. Este

modelo foi implementado no programa informático RStudio (Racine, 2012), utilizando o pacote (R *package*) “mixtools” (Benaglia, 2009). Os valores utilizados neste modelo foram os obtidos utilizando o ELISA com os VPLs para a variante GI.2 do vírus, uma vez que no modelo estatístico demonstrado em 3.1 da tabela S3 do Anexo 2 comprovou-se que esse método era consideravelmente mais eficaz na detecção da DHV.

Os níveis de anticorpos de cada indivíduo foram transformados utilizando o logaritmo da base 10. Foi implementado um modelo estocástico não paramétrico para dados independentes, que não assume qualquer tipo de distribuição para os dois subconjuntos dos dados (grupos positivos e negativos à doença em estudo). Assumiu-se que o modelo de mistura selecionado identificava corretamente diferentes populações e que a população com maior título de anticorpos representava indivíduos anteriormente expostos ao vírus da doença hemorrágica.

Foi calculada a probabilidade de cada animal pertencer aos subgrupos positivos ou negativos. A distribuição dos subconjuntos seropositivos e seronegativos deriva assim exclusivamente dos dados. A probabilidade de cada amostra pertencer a um dos subconjuntos foi estimada a partir de 1.000 iterações do modelo, e as amostras consideradas seropositivas quando a probabilidade estimada era >90%. Todas as restantes amostras foram classificadas como negativas. Os resultados obtidos foram assumidos como os verdadeiros estados serológicos de cada amostra, sendo assim utilizados como referência.

A Sensibilidade e Especificidade de cada ensaio de diagnóstico em cada ponto de corte foram estimados por comparação com a classificação de referência obtida a partir do modelo de mistura finita. Para cada possível ponto de corte, cada amostra foi classificada como positiva ou negativa. Com base nos resultados adquiridos, foi calculada a proporção de amostras concordantes no total de amostras utilizadas como referência. Desta maneira, foi possível calcular os valores da Sensibilidade e Especificidade, com base nos resultados obtidos das amostras dos animais positivos e dos negativos, respetivamente. A Sensibilidade foi calculada como a proporção das amostras seropositivas de referência que foram classificadas como seropositivas em cada ponto de corte, e a Especificidade a proporção das amostras seronegativas de referência que foram classificadas como seronegativas em cada ponto de corte.

Foi criada uma tabela no programa Excel contendo, para cada ponto de corte, os valores de Sensibilidade e Especificidade calculados em ambos os modelos. Foi comparada a correlação entre os resultados obtidos usando o programa RStudio (Racine, 2012). O coeficiente de correlação de Spearman é uma técnica que foi utilizada para estimar a força e direção (negativa ou positiva) de uma relação entre duas variáveis. O resultado poderá

assumir os valores entre -1 e 1. Quando mais próximo for o valor obtido de -1 ou 1 maior é a correlação entre os dois métodos utilizados.

Os modelos de mistura finita foram implementados utilizando o R *package* “mixtools” (Benaglia, T., 2009) no programa RStudio (Racine, J., 2012). Os intervalos de confiança modificados Wilson 95% de Sensibilidade e Especificidade foram estimados utilizando o R *package* “DescTools”.

### **2.2.3.3. Cálculo do ponto de corte ótimo para cada teste**

Os modelos implementados no programa E-Surge, tal como referido anteriormente, permitem retirar uma variedade de informações relativas à doença e à população em estudo. Para cada teste realizado existe um ponto de corte que otimiza tanto a sua Sensibilidade como a sua Especificidade. Selecionar o melhor ponto de corte é um passo fundamental para estudar os parâmetros epidemiológicos com um elevado grau de confiança e certeza.

Antes de avaliar parâmetros como a prevalência da doença, as taxas de sobrevivência ou de transição entre estados é importante determinar o ponto de corte ótimo para cada teste realizado. Após este passo, apenas se estuda e avalia os resultados obtidos no modelo com o ponto de corte ótimo.

Em cada animal foi recolhida uma amostra sanguínea para futura testagem serológica de certas doenças virológicas. Neste estudo, realizaram-se três testes diferentes para classificar cada animal como positivo ou negativo à Doença Hemorrágica Viral do coelho. Para cada teste, por apresentar diferenças significativas (nomeadamente ao antigénio utilizado), é necessário averiguar qual o melhor ponto de corte. Para a Mixomatose apenas um teste foi realizado pelo que o passo descrito em 1.2 não foi necessário. Foram realizados 4 testes:

- Teste 1: ELISA empregando antigénios GI.2 da DHV;
- Teste 2: ELISA empregando antigénios GI.1 da DHV;
- Teste 3: ELISA comercial para a DHV;
- Teste 4: ELISA comercial para a Mixomatose.

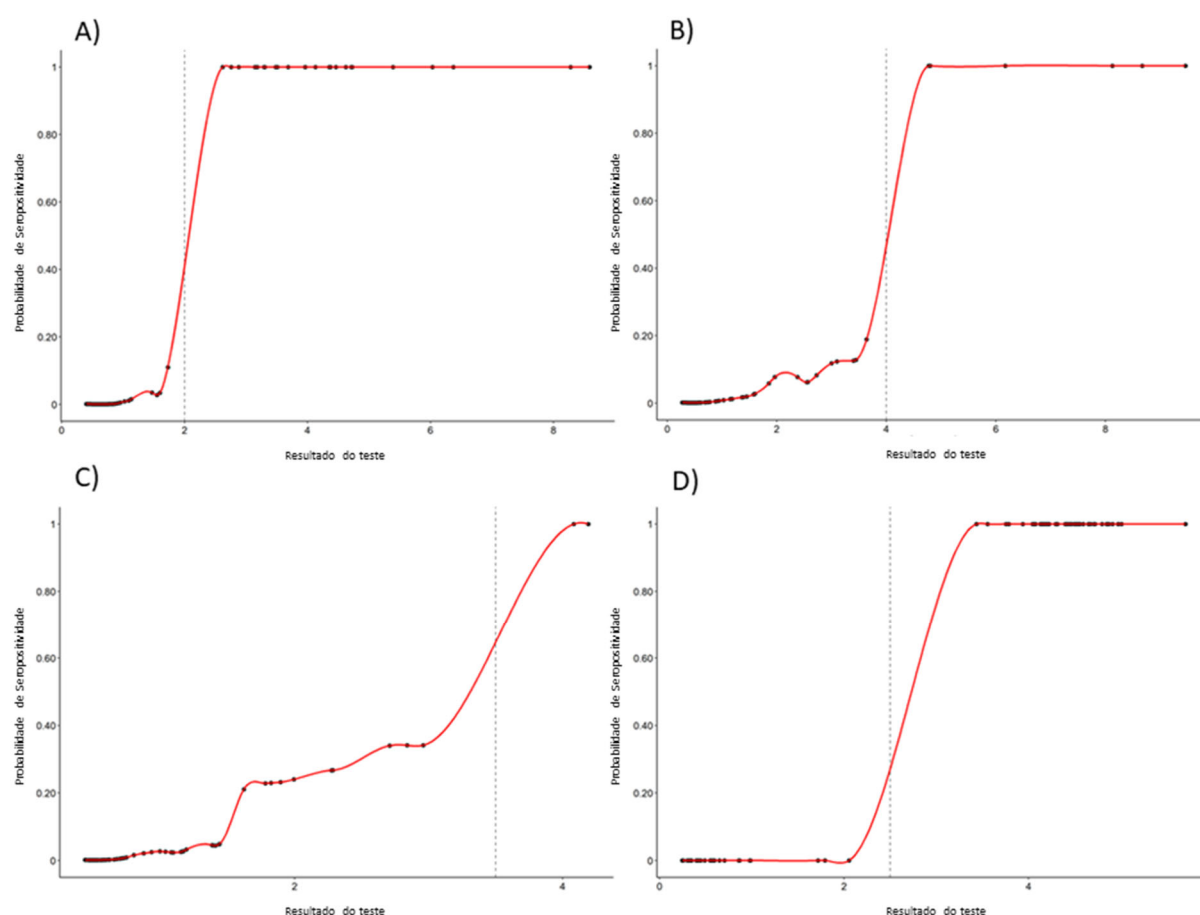
## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Comparação entre testes

#### 2.3.1.1. Ponto de corte

Este primeiro passo permite definir, utilizando um método comprovado (modelos de mistura finita), qual o valor a partir do qual, para cada teste, um animal é classificado como positivo.

Os pontos de corte ótimos para cada ensaio, selecionados por modelos de mistura finita, foram 2,0 para o DHV2/Teste 1, 4,0 para o DHV2/Teste 2, 3,5 para o DHV2/Teste 3 e 2,5 para o MYXV/Teste 4 (Gráfico 1). Utilizando os modelos de mistura finita, calculou-se os pontos de corte que maximizavam a eficácia do teste utilizado, isto é, o valor que permitia aumentar a certeza na classificação de um animal como positivo ou negativo.



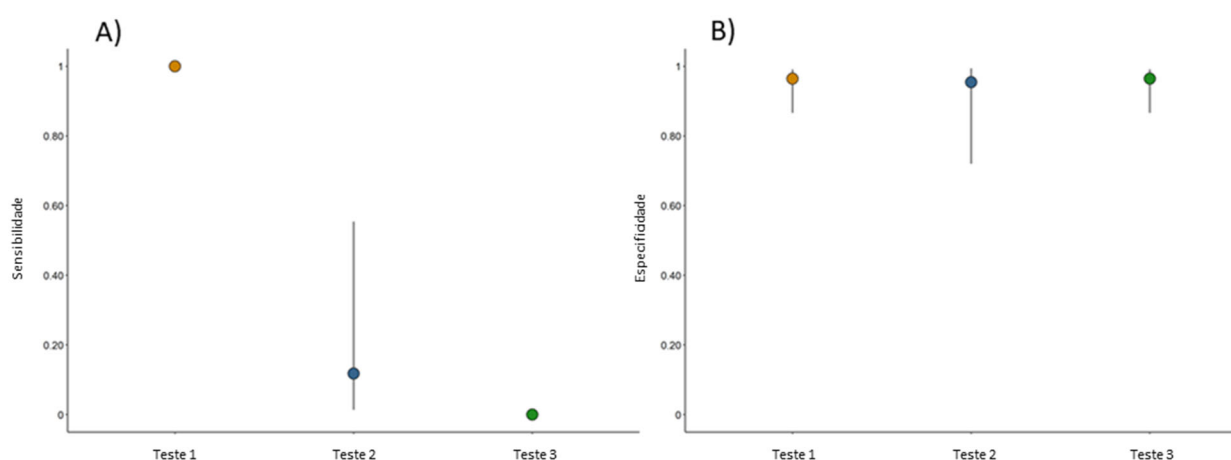
**Gráfico 1 - Probabilidade de seropositividade (vermelho) e ponto de corte selecionado (linha tracejada vertical) nos dados do sítio CL.**

Testes A) DHV2/teste 1, B) DHV2/ teste 2, C) DHV2/ teste 3 e MYXV/ teste 4.

### 2.3.1.2. Comparação dos testes realizados utilizando modelos CMR multi-evento

Os modelos CMR multi-eventos mostraram que, nos pontos de corte selecionados, o ELISA empregando antígenos GI.2 (DHV2/teste 1) superou largamente o ELISA contendo antígenos GI.1 (DHV2/ teste 2) e o ELISA comercial (DHV2/ teste 3).

Cada valor de Sensibilidade e Especificidade foi determinado a partir dos pontos de corte calculados anteriormente. Dessa maneira, estes parâmetros foram determinados nos pontos de corte 2.0, 4.0 e 1.5 para os ensaios DHV2/teste 1, DHV2/teste 2 e DHV2/teste 3, respectivamente. As diferenças foram mais evidentes nos valores de Sensibilidade, que foi estimada como 1 (IC 95% 1-1) para o DHV2/teste 1, 0,118 (IC 95% 0,014-0,554) para o DHV2/teste 2 e 0,0 (IC 95% 0,0-0,0) para o DHV2/teste 3 (Gráfico 2).



**Gráfico 2 - Desempenho de diagnóstico dos ensaios DHV2/teste 1, DHV2/teste 2 e DHV2/teste 3 no corte ótimo, estimado por modelos de captura-marcação-recaptura multi-eventos.**

A) Sensibilidade de cada teste de diagnóstico e B) Especificidade de cada teste de diagnóstico. Testes DHV2/teste 1 no ponto de corte 2.0 (laranja), DHV2/teste 2 no ponto de corte 4.0 (azul) e DHV2/teste 3 no ponto de corte 1.5 (verde).

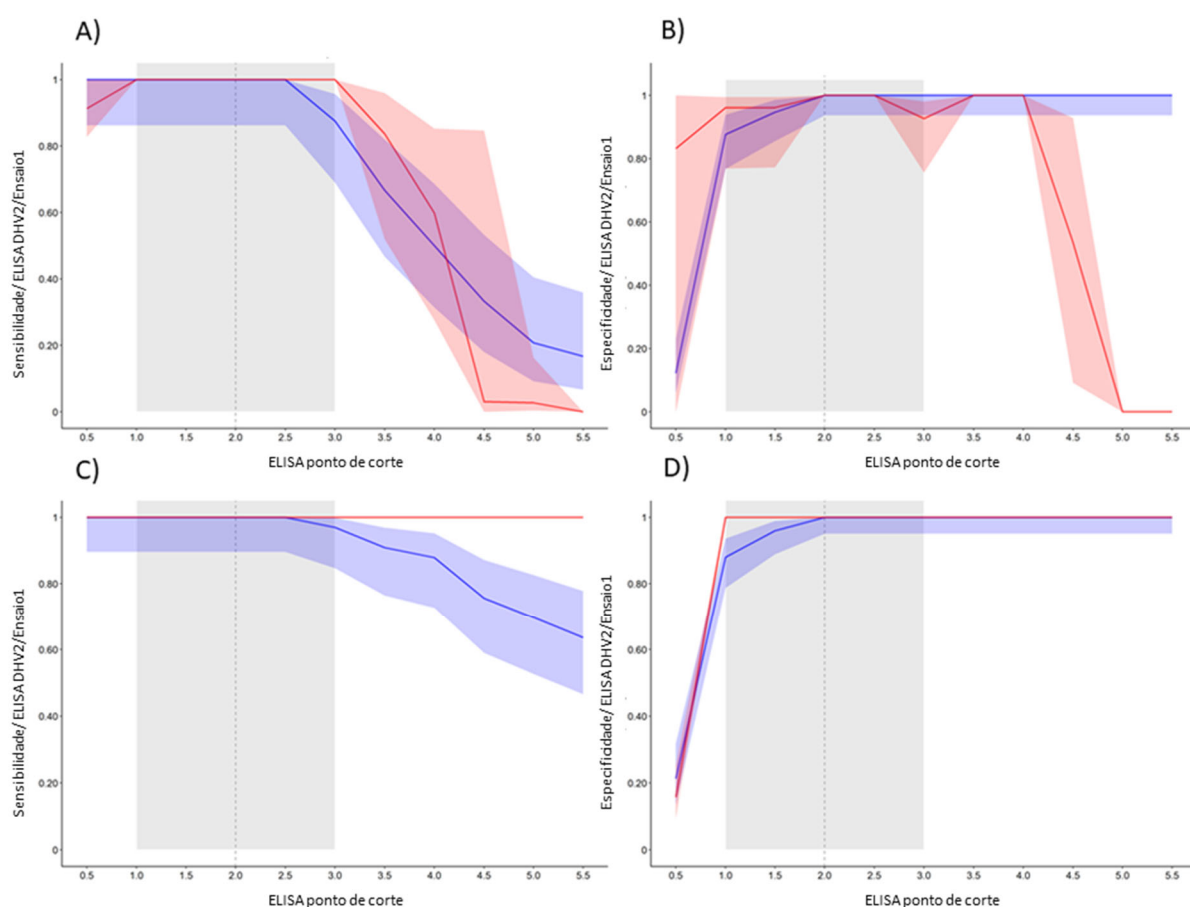
Como o ensaio serológico de melhor desempenho para a detecção de anticorpos para a DHV2 em soros de coelho foi ensaio 1, este foi assim selecionado para todas as análises subsequentes.



## 2.3.2. Desempenho de diagnóstico através de uma série de pontos de corte

### 2.3.2.1. DHV2/teste 1

No ponto de corte ótimo (2.0), a Sensibilidade e a Especificidade do DHV2/teste 1 estimado pelos modelos MECMR mais bem ajustados (ND: Modelo 1.1, Tabela S1; CL: Modelo 2.1, Tabela S2 do Anexo 2) são totalmente concordantes com as estimativas do método de referência (modelos de mistura finita) (Gráfico 3). A Sensibilidade e a Especificidade foram estimadas em 1, o que implica que este é um ensaio de diagnóstico perfeito no ponto de corte ótimo.

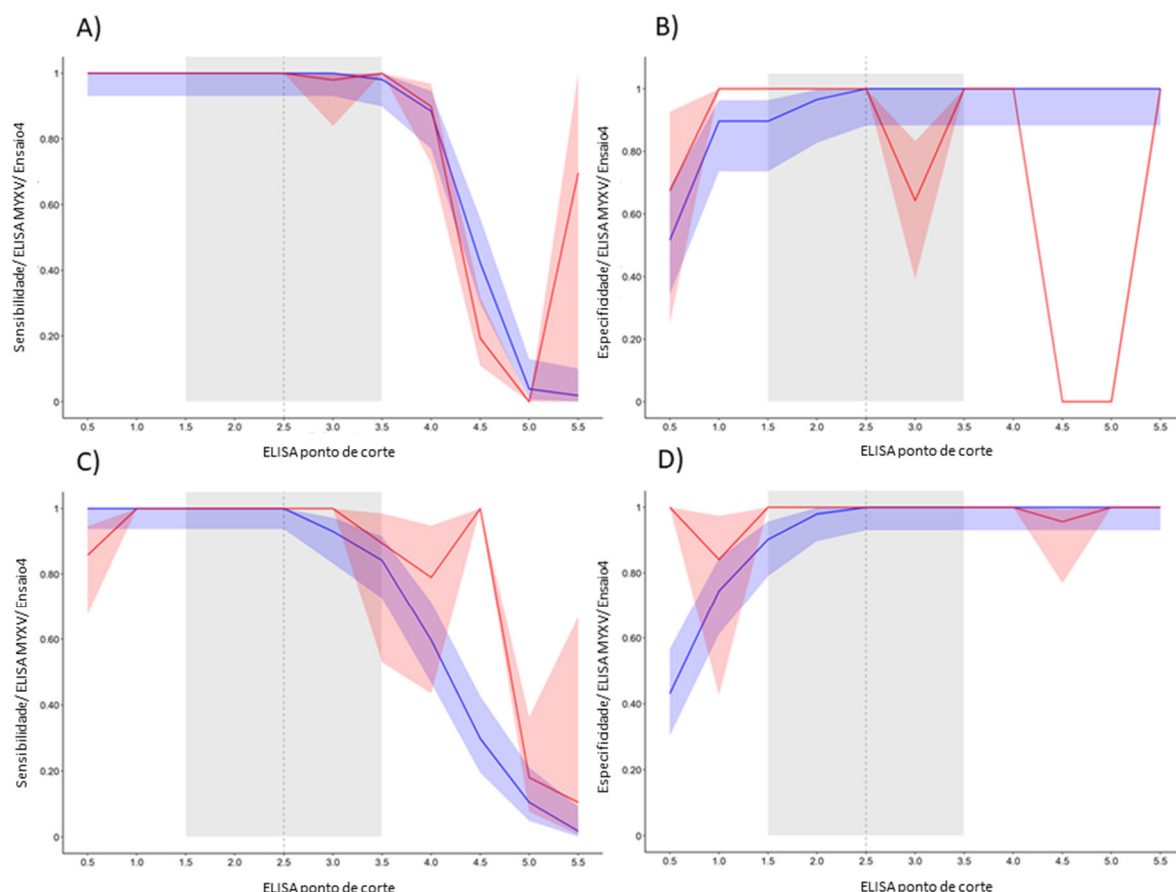


**Gráfico 3 - Desempenho de diagnóstico do DHV2/teste 1 através de uma gama de pontos de corte estimados por modelos de captura-marcação-recaptura multi-eventos e de mistura finita.**

Resultados dos modelos MECMR (vermelho) e de mistura finita (azul) para o local CL: A) Sensibilidade, B) Especificidade; e local ND: C) Sensibilidade e D) Especificidade. Corte selecionado como linha cinza tracejada.

### 2.3.2.2. MYXV/teste 4

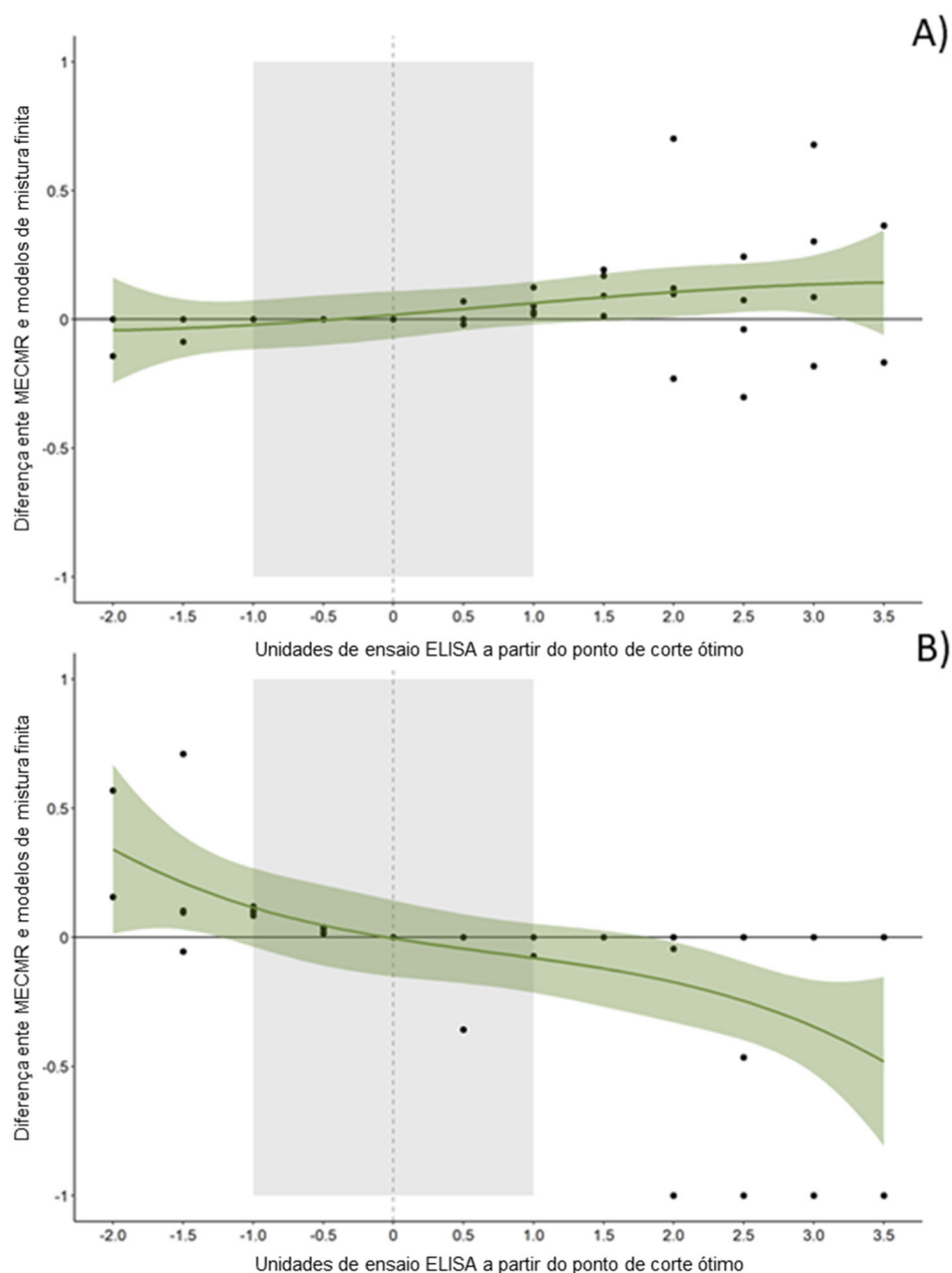
As estimativas da Sensibilidade e Especificidade pelos modelos MECMR mais suportados (ND: Modelo 3.1, Tabela S3; CL: Modelo 4.1, Tabela S4 do Anexo 2) são também totalmente concordantes com as estimativas dos modelos de mistura finita, no ponto de corte ótimo (2.5) (Gráfico 4). Mais uma vez, a Sensibilidade e a Especificidade foram estimadas em 1, o que implica que este é também um teste de diagnóstico perfeito no ponto de corte ótimo.



**Gráfico 4 - Sensibilidade diagnóstica e Especificidade do MYXV/teste 4 através de uma gama de pontos de corte, estimada por modelos de captura-marcação-recaptura de múltiplos eventos e mistura finita.**

Resultados dos modelos de MECMR (vermelho) e de mistura finita (azul) para o local CL: A) Sensibilidade, B) Especificidade; e local ND: C) Sensibilidade e D) Especificidade. Corte selecionado como linha cinzenta tracejada.

A diferença entre as estimativas da MECMR e os modelos de mistura finita da Sensibilidade e Especificidade foi sempre 0 nos pontos de corte seleccionados. Em pontos de corte extremamente baixos e altos, as estimativas por modelos MECMR podem divergir amplamente daquelas obtidas pelo método de referência. Esta divergência raramente se verifica no intervalo do ponto de corte seleccionado  $\pm 1$  unidade de ensaio (Gráfico 5).



**Gráfico 5 - Diferença entre as estimativas de desempenho de diagnóstico obtidas através de modelos de captura-mistura de vários eventos e de mistura finita numa gama de pontos de corte.**

Diferença em: A) Sensibilidade, e B) Especificidade. Regressão cúbica (verde) com o intervalo de confiança de 95% como área verde sombreada. Corte seleccionado como linha cinzenta tracejada.

Dados agrupados para ambos os locais e ensaios.

### 2.3.3. Parâmetros epidemiológicos

A proporção de amostras seropositivas para MYXV, no ponto corte ótimo, foi de 64,20% (IC95% 53,30% - 74,30%) na Companhia das Lezírias, e 52,80% (IC95% 43,40% - 61,90%) em Noudar.

Para DHV2, a proporção de amostras seropositivas no local Companhia das Lezírias foi de 29,60% (IC95% 20,80% - 40,30%) e no local Noudar foi de 30,60% (IC95% 22,70% - 39,80%) (Tabela 11).

As estimativas da sobrevivência mensal dos coelhos seropositivos para cada vírus não foram significativamente superiores às dos coelhos seronegativos, exceto para o MYXV no local de estudo de Noudar. Estas diferenças na sobrevivência foram maiores no local CL, particularmente para o MYXV (Tabelas 12 e 13).

Doença	Companhia das Lezírias		Noudar	
	Seroprevalência estimada (%)	IC95%	Seroprevalência estimada (%)	IC95%
<b>Mixomatose</b>	64,20	53,30 – 74,30	52,80	43,40 - 61,90
<b>Doença Hemorrágica Viral</b>	29,60	20,80 - 40,30	30,60	22,70 – 39,80

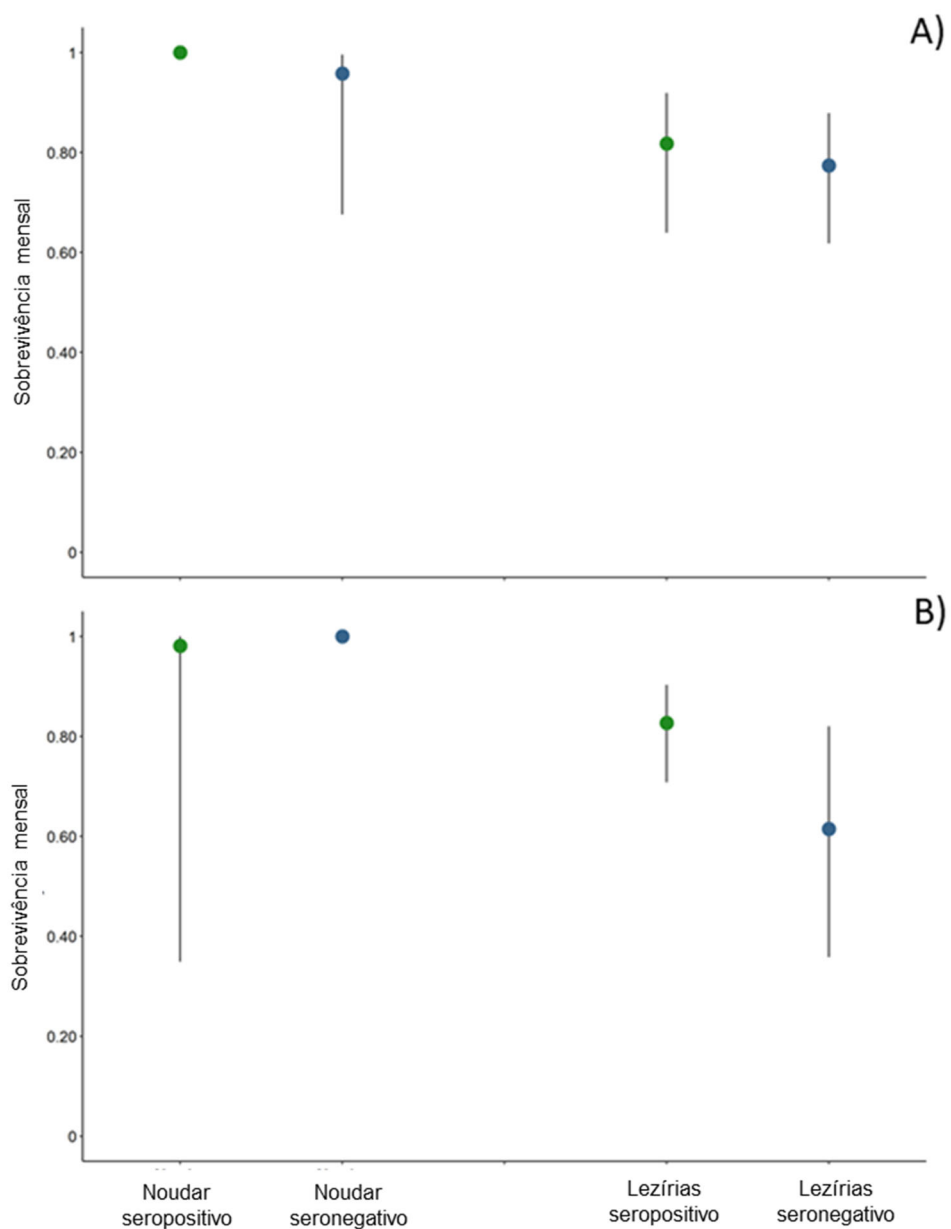
**Tabela 11 – Sero prevalência estimada para a Mixomatose e DHV nos locais de estudo**

Doença	Companhia das Lezírias		Noudar	
	Sobrevivência mensal (%)	IC95%	Sobrevivência mensal (%)	IC95%
<b>Mixomatose seropositivo</b>	82,70	70,80 – 90,30	98,10	34,90 - 100
<b>Mixomatose seronegativo</b>	61,50	35,80 - 82,0	100	100 - 100

**Tabela 12 – Sobrevivência mensal em coelhos seropositivos e seronegativos a Mixomatose**

Doença	Companhia das Lezírias		Noudar	
	Sobrevivência mensal (%)	IC95%	Sobrevivência mensal (%)	IC95%
<b>Doença Hemorrágica Viral seropositivo</b>	81,80	63,90 – 91,90	100	100 - 100
<b>Doença Hemorrágica Viral seronegativo</b>	77,40	61,80 - 87,90	95,80	67,60 - 99,60

**Tabela 13 – Sobrevivência mensal em coelhos seropositivos e seronegativos a DHV2**



**Gráfico 6 - Sobrevivência mensal dos coelhos europeus, estimada por modelos de captura-marcação-recaptura multieventos, por estado serológico e local de estudo.**  
 Sobrevivência de coelhos seropositivos (verdes) e seronegativos (azuis) para: A) vírus da doença hemorrágica do coelho, e B) vírus da Mixomatose.

## 2.4. Discussão

Neste estudo, demonstrou-se a aplicação dos modelos MECMR, que permitem calcular a probabilidade de atribuir corretamente um evento ao estado subjacente do animal, isto é, calcular a incerteza associada aos testes de diagnóstico utilizados (Genovart et al. 2012; Benhaïem et al. 2018), no cálculo do desempenho diagnóstico dos modelos serológicos para MYXV e DHV2 em coelhos bravo. Na ausência de testes de referência ou de amostras de estados de infecção conhecido, estes modelos provaram ser uma alternativa fiável aos métodos anteriormente utilizados para estimar estes parâmetros. Foram utilizados os modelos de mistura finita como método de referência que, igualmente, não se baseia em modelos ou amostras de referência. As estimativas da Sensibilidade e Especificidade diagnóstica para os vírus MYXV e DHV2, calculadas pelos dois modelos, nos seus pontos ótimos de corte, foram totalmente concordantes.

Os modelos apresentados estimam, assim, a probabilidade de um ensaio identificar corretamente o estado de infecção dos animais em cada encontro, calculando o desempenho diagnóstico dos testes serológicos usados.

Os modelos MECMR compararam ainda diretamente o desempenho diagnóstico de múltiplos testes dentro do mesmo modelo. Esta capacidade é particularmente útil para agentes patogénicos emergentes na fauna selvagem. Em muitos casos, por se tratarem de agentes emergentes, não existe um teste de diagnóstico de referência, pelo que comparar o desempenho diagnóstico de modelos previamente validados para agentes patogénicos relacionados pode ser determinante para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico eficaz (Peel et al. 2013).

Foram descritos métodos alternativos, que também estimam o desempenho diagnóstico de testes serológicos na ausência de modelos de referência ou amostras de estado de infecção conhecido, tais como os modelos de misturas finitas (Parker et al. 1990; Gardner et al. 2010; Peel et al. 2013). Neste estudo, estes modelos foram assumidos como sendo o ensaio de referência. Os modelos de misturas finitas não paramétricas não fazem pressupostos sobre a distribuição dos subconjuntos seropositivos e seronegativos dos dados. Estes subconjuntos podem ser estimados a partir dos resultados de um único ensaio de diagnóstico (Benaglia et al. 2009). Os modelos MECMR têm, face a estes dois métodos, a vantagem de estimar simultaneamente parâmetros epidemiológicos de interesse.

Recentemente, com o aparecimento da variante GI.2 responsável pela Doença Hemorrágica Viral, verificou-se uma elevada mortalidade de coelho bravo associado a um grande declínio do número de populações desta espécie. Após o seu aparecimento em

coelhos bravos na Península Ibérica e noutros locais, a variante GI.2 substituiu a GI.1 (Lopes et al. 2015; Strive et al. 2020). Embora se verifique uma reatividade serológica cruzada limitada entre estas variantes, esperava-se que esta reatividade fosse consideravelmente superior à verificada para os antígenos da variante GI.2, que, atualmente, é a variante em maior circulação em populações de coelho bravo (Strive et al. 2020).

Na ausência de um teste de diagnóstico de referência, procurou-se, neste estudo, determinar qual o teste que mais eficientemente classificasse corretamente o estado fisiológico de cada animal. Com este propósito realizaram-se 3 testes diferentes, descritos anteriormente, com o intuito de determinar o mais eficiente e de procurar descrever o impacto causado pela variante GI.2 da DHV.

Foi importante determinar para todos os testes os pontos de corte ótimos com o intuito de poder comparar as Sensibilidades e as Especificidades obtidas, determinando, assim, qual o melhor teste de diagnóstico. Este passo foi realizado utilizando modelos de mistura finita, uma vez que se tratava de um método já comprovado e fiável (gráfico 1).

Ficou demonstrado, neste estudo, que o desempenho diagnóstico do DHV2/ensaio 1, empregando antígenos da variante GI.2, é superior ao dos dois testes que utilizavam antígenos da variante GI.1 (Bárcena et al. 2015). Analisando o gráfico 2, pode-se determinar o teste de diagnóstico mais eficaz, isto é, aquele que, no ponto de corte ótimo, apresenta os valores de Sensibilidade e Especificidade mais elevados. Verificou-se, em ambas as populações estudadas, que a Especificidade em todos os testes para a DHV2 foi estimada como perfeita (100%). Por outro lado, a Sensibilidade variou entre 0% (Ensaio 3), 11,80% (Ensaio 2) e 100% (Ensaio 1), de acordo com as expectativas. Conclui-se assim que a ELISA indireta empregando antígenos GI.2, descritos por Bárcena et al. (2015), foi um teste de diagnóstico serológico perfeito para anticorpos específicos contra a DHV2 em coelhos bravo. O desempenho diagnóstico destes testes não tinha sido avaliado anteriormente.

Através da análise dos gráficos 3 e 4, conclui-se que, ao utilizar pontos de corte mais extremos e irrealistas, os valores de Sensibilidade e Especificidade calculados pelos modelos MECMR podem divergir largamente quando comparado com as estimativas obtidas pelo método de referência. Esta falta de concordância observada pode ser atribuída a uma maior incerteza na atribuição do estado devido ao baixo número de eventos classificados como seropositivos, quando se utilizam pontos de corte elevados, ou seronegativos, quando se utilizam pontos de corte baixos. Quando se utiliza pontos de corte mais extremos e se obtém um número reduzido de animais quer seropositivos, quer seronegativos, os modelos MECMR apresentam uma menor capacidade de estimar os parâmetros pretendidos, como a Sensibilidade e a Especificidade dos testes serológicos utilizados (Benhaiem et al. 2018).

Consequentemente, tal como esperado, os valores de Sensibilidade divergiram mais nos pontos de corte mais altos devido a uma grande percentagem de falsos negativos, ou seja, muitos indivíduos foram classificados como negativos quando apresentavam um estado de infeção positivo. Por outro lado, os valores de Especificidade divergiram mais nos pontos de corte mais baixos devido a uma grande percentagem de falsos positivos, ou seja, uma grande percentagem dos coelhos foi classificada como positiva, quando na realidade não eram portadores da doença em causa (Florkowski 2008).

Era expectável obter Especificidades na ordem dos 100% e Sensibilidades baixas utilizando pontos de corte excessivamente elevados. Utilizando estes pontos de corte, os animais detetados como positivos apresentam uma elevada probabilidade de se encontrar realmente positivos, apresentando desta maneira uma alta Especificidade. Contudo, para estes valores espera-se obter uma Sensibilidade baixa, uma vez que, existe um grande número de animais que, apesar de apresentarem um resultado negativo, na realidade encontravam-se infetados com a doença em estudo (Florkowski 2008).

Nos pontos de corte ótimos analisados, as estimativas tendem a concordar entre os modelos MECMR e de mistura finita. No ponto de corte ideal, onde a Sensibilidade e a Especificidade do teste utilizado estão otimizadas, ambos os modelos apresentam resultados semelhantes. Isto comprova que os modelos MECMR podem estimar, de forma fiável, o desempenho do diagnóstico, apesar de utilizarem um ponto de corte ligeiramente abaixo ou ligeiramente acima do ótimo. Esta característica é relevante para avaliar modelos de agentes patogénicos emergentes em novas espécies hospedeiras. Em muitos destes casos, testes de diagnósticos perfeitos e estados de infeção conhecidos são situações que dificilmente tem correspondência com a realidade quando se efetuam estudos em populações selvagens ou em doenças emergentes (Gardner et al. 2010; Gilbert et al. 2013).

Após ter sido identificado o melhor ensaio (DHV2/ensaio 1, empregando antigénios da variante GI.2), o melhor ponto de corte para este ensaio (2.0) e o melhor ponto de corte para o MYXV/ensaio 4, 2.5, utilizou-se apenas este modelo para a determinação dos restantes parâmetros epidemiológicos, nomeadamente a seroprevalência de cada doença e a sobrevivência mensal.

A seroprevalência DHV2 na amostra (29,60% para o local Companhia das Lezírias e 30,60% para o local Noudar) foi semelhante à relatada no sudoeste da Península Ibérica em 2013-2015, logo após o seu aparecimento (Rouco et al. 2018). O facto de, atualmente, não se verificar um aumento da seroprevalência, quando comparada com os valores obtidos na altura do seu aparecimento, poderia indicar que as populações europeias de coelhos não estão a progredir no sentido de estabelecer a imunidade de grupo à DHV2. No entanto, é



importante ter em consideração que outros fatores podem igualmente afetar a seroprevalência calculada, nomeadamente a densidade populacional. Além disso, neste ensaio em particular, uma vez que as populações em estudo não se sobrepõem entre si, os valores de seroprevalência calculados podem também ser afetados (García-Bocanegra et al. 2011).

A ausência de valores de sobrevivência significativamente reduzidos em coelhos europeus seronegativos para a DHV2 sugere que este vírus não se encontrava em circulação nas populações em estudo, em 2018-2020, comprovado pelos modelos MECMR mais bem ajustados (Modelo 1.1, e 1.2, Tabela S1; e Modelo 2.1 e 2.2, Tabela S2 do Anexo 2), estimando a incidência nula para a infeção por DHV2.

No local de estudo da Companhia das Lezírias, não houve diferenças significativas na sobrevivência mensal entre os coelhos seropositivos e seronegativos para a DHV2, apresentando ambos valores na ordem dos 80% (gráfico 6 e tabela 13). Os valores obtidos de sobrevivência foram concordantes com os obtidos por Calvete (2018) e Le Gall-Reculé (2013). É importante ter em consideração que neste local de estudo, os coelhos encontram-se expostos a predadores, pelo que os valores de sobrevivência podem ser afetados pela falta de ambiente controlado. Contudo, no mesmo local de estudo, verificou-se uma sobrevivência inferior para coelhos seropositivos à MYXV (61,5%) (tabela 12).

Constatou-se um efeito sinérgico da Mixomatose e da doença hemorrágica do coelho na sobrevivência individual do coelho, porque Barnett et al. (2018) também observou que os surtos da DHV apresentaram um impacto negativo maior na sobrevivência dos coelhos que tinham sido anteriormente expostos à Mixomatose face aos que nunca foram expostos a qualquer um dos vírus.

Durante as sessões de captura realizadas, não foram identificados coelhos com sinais clínicos típicos de Mixomatose. A falta de indivíduos com sintomatologia clínica, associada a uma incidência nula para MYXV no local CL, estimada pelos modelos MECMR (modelos 4.1 e 4.2, tabela S4 do Anexo 2), indiciam a possibilidade de ter ocorrido um surto de MYXV com elevada mortalidade associada. Esta suposição pode ser justificada pelo aparecimento de um novo MYXV recombinante, que surgiu na lebre ibérica, *Lepus granatensis*, em 2018 (García-Bocanegra et al. 2011) e que, desde então, demonstrou ser patogénico para os coelhos europeus (Abade dos Santos et al. 2020).

Os dois locais de estudo apresentam características diferentes. A população de coelhos do local de estudo ND tem acesso a água e alimento “*ad libitum*” e está essencialmente protegida dos seus predadores terrestres naturais. Em oposição, no local de estudo CL, os coelhos estão sujeitos a predação e não existe qualquer tipo de gestão. Estes

fatores contribuem para que a sobrevivência estimada seja na próxima de 100% em Noudar, tanto para coelhos seropositivos como para os seronegativos, quer para a MYXV, quer para a DHV (gráfico 6). No entanto, os resultados obtidos sugerem taxas de mortalidade bastante diferentes de MYXV nos dois locais de estudo. É necessário a realização de um estudo mais aprofundado para determinar quais as estirpes de MYXV que circulam nestas populações de coelhos bravo.

A probabilidade de um indivíduo transitar de um estado seropositivo para seronegativo foi fixada como nula. Estes resultados são consistentes com a observação de que os sobreviventes de infecções naturais com o vírus da doença Mixomatose ou com o vírus da doença hemorrágica do coelho parecem adquirir anticorpos específicos para toda a vida (Cooke 2002; Kerr et al. 2010). Nos modelos onde não se fixou este parâmetro, os modelos MECMR estimaram esta probabilidade como nula.

## **2.5. Limitações**

O conjunto de dados analisado é consideravelmente espaçado em tempo, limitando, assim, a quantidade de parâmetros que podem ser estimados a partir do modelo. Com conjuntos de dados maiores e menos espaçados, estes parâmetros eco-epidemiológicos poderiam ser estimados ao longo do intervalo de tempo definido para o estudo, incorporando outras co-variáveis como o sexo e a idade. Desta maneira, é possível obter uma maior compreensão do impacto da Mixomatose e da Doença Hemorrágica Viral em coelhos bravo, bem como, a compreensão de quais as medidas de conservação mais eficazes.

Neste estudo, foi calculada a percentagem de observações parciais, isto é, a quantidade de indivíduos do estudo que eram capturados, mas sem recolha de amostras (valor dado pela matriz da tabela 6). No local de estudo Noudar, este valor correspondia a 15%, enquanto que na Companhia das Lezírias cerca de 35,5% dos encontros não incluíam recolha de amostras. Benhaïem et al. (2018) comprovou que as estimativas dos parâmetros dos modelos MEMCR são robustas aos níveis de observações parciais.

### III – CONCLUSÕES

O coelho bravo, *Oryctolagus cuniculus*, desempenha um papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas onde persiste. É uma espécie responsável pela manutenção de inúmeras outras, tais como o lince ibérico e a águia imperial ibérica, apresentando ainda um importante impacto na vegetação do habitat onde reside (Ferreira 2012).

O declínio das populações de coelho bravo, levou a que esta espécie fosse classificada como ameaçada globalmente e desencadeou uma cadeia de eventos nos ecossistemas (Villafuerte and Delibes-Mateos 2019). Tal como anteriormente referido, o aparecimento da Doença Hemorrágica Viral e da Mixomatose foi o principal responsável pela redução observada do número de coelhos. A importância desta espécie no equilíbrio dos ecossistemas levou à realização de vários estudos, tal como o descrito neste trabalho, com o objetivo de perceber os mecanismos do declínio, recuperar e de reintroduzir o coelho bravo nos ecossistemas onde antes existiam em abundância (Arenas et al. 2006; Ferreira 2012).

Recorrentemente, surgem na natureza novas doenças infecciosas que podem causar impactos relevantes em populações e ecossistemas, bem exemplificadas pela situação pandémica que nos atingiu desde final de 2019 causado pelo vírus SARS-CoV2, proveniente, provavelmente, de um quiróptero (Andersen et al. 2020). O desenvolvimento de métodos que possibilitem realizar estudos epidemiológicos em natureza com quantificação da incerteza permite, não só, combater, de forma mais eficaz, as doenças já existentes, bem como apresentar uma resposta mais rápida e eficaz aquando o surgimento de novas doenças infecciosas. É importante compreender e avaliar a progressão de doenças e como estas atuam nas populações infetadas de forma a poder conceber bons métodos de controlo das mesmas. Quando se pretende investigar doenças e o impacto destas em ambientes não controlados, especificamente na natureza e em populações selvagens, torna-se fundamental a criação de métodos que permitem estimar os parâmetros pretendidos, cuja eficácia não dependa de amostras de indivíduos com estado de infeção conhecido. Outro importante fator a ter em consideração na realização destes estudos é a incerteza associada à atribuição de estados e a forma como ela pode influenciar a estimativa dos parâmetros pretendidos. Os modelos multi-eventos captura-marcação-recaptura são utilizados em estudos epidemiológicos na ausência de outro ensaio assumido como referência ou amostras de estado de infeção conhecido (Lebreton et al. 1992).

Os modelos MECMR demonstraram ser eficazes em estudos epidemiológicos que envolvam certo grau de incerteza na atribuição de estado a cada indivíduo, permitindo, desta

maneira, estimar parâmetros epidemiológicos sem estados de infecção conhecidos ou modelos de referência. Foi observada uma boa correlação positiva com os modelos de mistura finita, que, tal como esperado, demonstraram ser um método eficaz para este tipo de estudos. Concluímos que os modelos MECMR podem estimar com fiabilidade o desempenho diagnóstico dos testes serológicos para MYXV e DHV2 em coelhos bravos. Estes modelos são igualmente uma ferramenta eficaz para estimar parâmetros epidemiológicos, como a prevalência de doenças, as taxas de sobrevivência entre campanhas e a transição entre estados fisiológicos. Os modelos MECMR permitiram determinar, com fiabilidade, o teste serológico mais eficaz, sendo este o teste 2, aquele que apresentava os valores de Sensibilidade e Especificidade mais elevados, nos pontos de corte ótimos. Os valores de sobrevivência foram igualmente concordantes com outros estudos realizados. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que estes modelos podem ser uma ferramenta útil para estimar parâmetros epidemiológicos contabilizando a incerteza associada à sua determinação e à atribuição de estados fisiológicos.

## BIBLIOGRAFIA

- Abade dos Santos FA, Carvalho CL, Pinto A, Rai R, Monteiro M, Carvalho P, Mendonça P, Peleteiro MC, Parra F, Duarte MD. 2020. Detection of recombinant hare myxoma virus in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus*). *Viruses*. 12(10):1–12. doi:10.3390/v12101127.
- Abrantes J, Van Der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): A review. *Vet Res*. 43(1):12. doi:10.1186/1297-9716-43-12.
- Ades AE, Price MJ, Kounali D, Akande VA, Wills GS, McClure MO, Muir P, Horner PJ. 2017. Proportion of Tubal Factor Infertility due to Chlamydia: Finite Mixture Modeling of Serum Antibody Titers. *Am J Epidemiol*. 185(2):124–134. doi:10.1093/aje/kww117.
- Almanza, H., Cubillos, C., Angulo, I., Mateos, F., Caston, J. R., van der Poel, W. H., Vinje, J., Bárcena, J., & Mena, I. (2008). Self-assembly of the recombinant capsid protein of a swine norovirus into virus-like particles and evaluation of monoclonal antibodies cross-reactive with a human strain from genogroup II. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3971–3979. <https://doi.org/10.1128/JCM.01204-08>
- Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 26(4):450–452. doi:10.1038/s41591-020-0820-9.
- Arenas AJ, Astorga RJ, García I, Varo A, Huerta B, Carbonero A, Cadenas R, Perea A. 2006. Captive Breeding of Wild Rabbits: Techniques and Population Dynamics. *J Wildl Manage*. 70(6):1801–1804. doi:10.2193/0022-541x(2006)70[1801:cbowrt]2.0.co;2.
- Bárcena J, Guerra B, Angulo I, González J, Valcárcel F, Mata CP, Castón JR, Blanco E, Alejo A. 2015. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Vet Res*. 46(1):1–6. doi:10.1186/s13567-015-0245-5.
- Barnett LK, Prowse TAA, Peacock DE, Mutze GJ, Sinclair RG, Kovaliski J, Cooke BD, Bradshaw CJA. 2018. Previous exposure to myxoma virus reduces survival of European rabbits during outbreaks of rabbit haemorrhagic disease. *J Appl Ecol*. 55(6):2954–2962. doi:10.1111/1365-2664.13187.
- Baughman, A. L., Bisgard, K. M., Edwards, K. M., Guris, D., Decker, M. D., Holland, K., Meade, B. D., & Lynn, F. (2004). Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(6), 1045-1053. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.6.1045-1053.2004>
- Baughman AL, Bisgard KM, Lynn F, Meade BD. 2006. Mixture model analysis for establishing a diagnostic cut-off point for pertussis antibody levels. *Stat Med*. 25(17):2994–3010. doi:10.1002/sim.2442.
- Benaglia T, Chauveau D, Hunter DR, Young DS. 2009. Mixtools: An R package for analyzing finite mixture models. *J Stat Softw*. 32(6):1–29. doi:10.18637/jss.v032.i06.
- Benhaiem S, Marescot L, Hofer H, East ML, Lebreton JD, Kramer-Schadt S, Gimenez O. 2018. Robustness of eco-epidemiological capture-recapture parameter estimates to variation in infection state uncertainty. *Front Vet Sci*. 5(AUG):1–13. doi:10.3389/fvets.2018.00197.
- Bertagnoli, S., & Marchandeau, S. 2015. Myxomatosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(2), 549-56.

- Best SM, Kerr PJ. 2000. Coevolution of host and virus: The pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible european rabbits. *Virology*. 267(1):36–48. doi:10.1006/viro.1999.0104.
- Calvete C. 2006. Modeling the Effect of Population Dynamics on the Impact of Rabbit Hemorrhagic Disease. *Conserv Biol*. 20(4):1232–1241. doi:10.1111/j.1523-1739.2006.00371.x.
- Calvete C, Mendoza M, Alcaraz A, Sarto MP, Jiménez-de-Bagüés MP, Calvo AJ, Monroy F, Calvo JH. 2018. Rabbit haemorrhagic disease: Cross-protection and comparative pathogenicity of GI.2/RHDV2/b and GI.1b/RHDV lagoviruses in a challenge trial. *Vet Microbiol*. 219(January):87–95. doi:10.1016/j.vetmic.2018.04.018.
- Choquet R, Lebreton JD, Gimenez O, Reboulet AM, Pradel R. 2009a. U-CARE: Utilities for performing goodness of fit tests and manipulating CAPture-REcapture data. *Ecography (Cop)*. 32(6):1071–1074. doi:10.1111/j.1600-0587.2009.05968.x.
- Choquet, R., Rouan, L., & Pradel, R. 2009b. Program E-SURGE: a software application for fitting multievent models. In D. L. Thomson, E. G. Cooch, & M. J. Conroy (Eds.), *Modeling demographic processes in marked populations* (pp. 845–865). Environmental and ecological statistics series, Vol. 3, Springer-Verlag.
- Cooke BD. 2002. Rabbit haemorrhagic disease: Field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *OIE Rev Sci Tech*. 21(2):347–358. doi:10.20506/rst.21.2.1337.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science* (80- ). 287(5452):443–449. doi:10.1126/science.287.5452.443.
- Delibes-Mateos M, Ferreira C, Carro F, Escudero MA, Gortázar C. 2014. Ecosystem effects of variant rabbit hemorrhagic disease virus, Iberian Peninsula. *Emerg Infect Dis*. 20(12):2166–2168. doi:10.3201/eid2012.140517.
- Delibes-Mateos M, Ferreras P, Villafuerte R. 2009. European rabbit population trends and associated factors: A review of the situation in the Iberian Peninsula. *Mamm Rev*. 39(2):124–140. doi:10.1111/j.1365-2907.2009.00140.x.
- Deng H, Dam-Deisz C, Luttikholt S, Maas M, Nielen M, Swart A, Vellema P, van der Giessen J, Opsteegh M. 2016. Risk factors related to *Toxoplasma gondii* seroprevalence in indoor-housed Dutch dairy goats. *Prev Vet Med*. 124:45–51. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.12.014.
- Devineau, O., Choquet, R., & Lebreton, J. D. 2006. Planning capture—recapture studies: straightforward precision, bias, and power calculations. *Wildlife Society Bulletin*, 34(4), 1028-1035.
- Encarnação C, Medinas D, Alves PC, Mira A. 2019. Does short-term habitat management for the european rabbit (*oryctolagus cuniculus*) have lasting effects? *Aust J Polit Hist*. 65(1):296–308. doi:10.1111/1440-1703.1064.
- Engering A, Hogerwerf L, Slingenbergh J. 2013. Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerg Microbes Infect*. 2(May). doi:10.1038/emi.2013.5.
- Fenner F, Marshall ID. 1957. A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J Hyg (Lond)*. 55(2):149–191. doi:10.1017/S0022172400037098.
- Fenner, F., Ross, J. 1994. Myxomatosis. In *The European rabbit. The history and biology of a successful colonizer* (H. V. Thompson and C. M. King, Eds.), pp. 205±240. Oxford University Press, Oxford.

- Ferreira C. 2012. European rabbit research in the Iberian Peninsula: State of the art and future perspectives. *Eur J Wildl Res.* 58(6):885–895. doi:10.1007/s10344-012-0664-9.
- Ferreras P, Travaini A, Cristina Zapata S, Delibes M. 2011. Short-term responses of mammalian carnivores to a sudden collapse of rabbits in Mediterranean Spain. *Basic Appl Ecol.* 12(2):116–124. doi:10.1016/j.baae.2011.01.005.
- Florkowski CM. 2008. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. *Clin Biochem Rev.* 29 Suppl 1(August):S83-7.
- Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeu S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin JL, Lemaitre E, et al. 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res.* 44(1):1–13. doi:10.1186/1297-9716-44-81.
- Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guérin JL, Marchandeu S. 2011. Virology: Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec.* 168(5):137–138. doi:10.1136/vr.d697.
- García-Bocanegra I, Astorga RJ, Napp S, Huerta B, Carbonero A, Perea A, Arenas A. 2011. Factors affecting the seroprevalence of lagovirus infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Southern Spain. *Vet J.* 189(1):89–94. doi:10.1016/j.tvjl.2010.06.009.
- Gardner IA, Greiner M, Dubey JP. 2010. Statistical Evaluation of Test Accuracy Studies for *Toxoplasma gondii* in Food Animal Intermediate Hosts. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01281.x.
- Genovart M, Pradel R, Oro D. 2012. Exploiting uncertain ecological fieldwork data with multi-event capture-recapture modelling: An example with bird sex assignment. *J Anim Ecol.* 81(5):970–977. doi:10.1111/j.1365-2656.2012.01991.x.
- Gilbert AT, Fooks AR, Hayman DTS, Horton DL, Müller T, Plowright R, Peel AJ, Bowen R, Wood JLN, Mills J, et al. 2013. Deciphering serology to understand the ecology of infectious diseases in wildlife. *Ecohealth.* 10(3):298–313. doi:10.1007/s10393-013-0856-0.
- Guerrero-Casado J, Carpio AJ, Tortosa FS. 2016. Recent negative trends of wild rabbit populations in southern Spain after the arrival of the new variant of the rabbit hemorrhagic disease virus RHDV2. *Mamm Biol.* 81(4):361–364. doi:10.1016/j.mambio.2016.03.006.
- Jennelle CS, Cooch EG, Conroy MJ, Senar JC. 2007. State-specific detection probabilities and disease prevalence. *Ecol Appl.* 17(1):154–167. doi:10.1890/1051-0761(2007)017[0154:SDPADP]2.0.CO;2.
- Kerr PJ. 2012. Myxomatosis in Australia and Europe: A model for emerging infectious diseases. *Antiviral Res.* 93(3):387–415. doi:10.1016/j.antiviral.2012.01.009.
- Kerr PJ, Hone J, Perrin L, French N, Williams CK. 2010. Molecular and serological analysis of the epidemiology of myxoma virus in rabbits. *Vet Microbiol.* 143(2–4):167–178. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.025.
- Lebreton, J. D., Burnham, K. P., Clobert, J., & Anderson, D. R. 1992. Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological monographs*, 62(1), 67-118.
- Lees AC, Bell DJ. 2008. A conservation paradox for the 21st century: The European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*, an invasive alien and an endangered native species. *Mamm*

- Rev. 38(4):304–320. doi:10.1111/j.1365-2907.2008.00116.x.
- Li Y, Wang G, Li N, Wang Y, Zhu Q, Chu H, Wu W, Tan Y, Yu F, Su XD, et al. 2020. Structural insights into immunoglobulin M. *Science* (80- ). 367(6481):1014–1017. doi:10.1126/science.aaz5425.
- Lopes AM, Correia J, Abrantes J, Melo P, Ramada M, Magalhães MJ, Alves PC, Esteves PJ. 2015. Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in portuguese wild rabbit populations? *Viruses*. 7(1):27–36. doi:10.3390/v7010027.
- Marshall ID, Fenner F. 1958. Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. *J Hyg (Lond)*. 56(2):288–302. doi:10.1017/S0022172400037773.
- Martins H, Miller DR, Elston DA, Rego F, Milne JA. 2002. Factors influencing the location and number of entrances of European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) warrens in a Southern Portuguese montado. *J Mediterr Ecol*. 3(4):31–40.
- McClintock BT, Nichols JD, Bailey LL, MacKenzie DI, Kendall WL, Franklin AB. 2010. Seeking a second opinion: Uncertainty in disease ecology. *Ecol Lett*. 13(6):659–674. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01472.x.
- Meyer A, Bond K, Van Winden S, Green M, Guitian J. 2018. A probabilistic approach to the interpretation of milk antibody results for diagnosis of Johne's disease in dairy cattle. *Prev Vet Med*. 150:30–37. doi:10.1016/j.prevetmed.2017.11.016.
- Migchelsen SJ, Martin DL, Southisombath K, Turyaguma P, Heggen A, Rubangakene PP, Joof H, Makalo P, Cooley G, Gwyn S, et al. 2017. Defining Seropositivity Thresholds for Use in Trachoma Elimination Studies. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(1):1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0005230.
- Monterroso P, Garrote G, Serronha A, Santos E, Delibes-Mateos M, Abrantes J, De Ayala RP, Silvestre F, Carvalho J, Vasco I, et al. 2016. Disease-mediated bottom-up regulation: An emergent virus affects a keystone prey, and alters the dynamics of trophic webs. *Sci Rep*. 6(October). doi:10.1038/srep36072.
- Parker RA, Erdman DD, Anderson LJ. 1990. Use of mixture models in determining laboratory criterion for identification of seropositive individuals: application to parvovirus B19 serology. *J Virol Methods*. 27(2):135–144. doi:10.1016/0166-0934(90)90130-8.
- Peacock D, Abbott I. 2013. The role of quoll (*Dasyurus*) predation in the outcome of pre-1900 introductions of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to the mainland and islands of Australia. *Aust J Zool*. 61(3):206–280. doi:10.1071/ZO12129.
- Peel AJ, McKinley TJ, Baker KS, Barr JA, Crameri G, Hayman DTS, Feng YR, Broder CC, Wang LF, Cunningham AA, et al. 2013. Use of cross-reactive serological assays for detecting novel pathogens in wildlife: Assessing an appropriate cutoff for henipavirus assays in African bats. *J Virol Methods*. 193(2):295–303. doi:10.1016/j.jviromet.2013.06.030.
- Le Pendu, J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Guitton, J. S., Le Gall-Reculé, G., Lopes, A. M., ... & Esteves, P. 2017. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *Journal of General Virology*, 98(7), 1658-1666.
- Pradel R. 2005. Multievent: An extension of multistate capture-recapture models to uncertain states. *Biometrics*. 61(2):442–447. doi:10.1111/j.1541-0420.2005.00318.x.
- Pradel R, Sanz-Aguilar A. 2012. Modeling trap-awareness and related phenomena in capture-recapture studies. *PLoS One*. 7(3). doi:10.1371/journal.pone.0032666.
- Racine, J. S. 2012. RStudio: a platform-independent IDE for R and Sweave.



- Rosell JM, de la Fuente LF, Parra F, Dalton KP, Sáiz JIB, de Rozas AP, Díez JJB, de Luco DF, Casal J, Majó N, et al. 2019. Myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease: A 30-year study of the occurrence on commercial farms in Spain. *Animals*. 9(10):1–16. doi:10.3390/ani9100780.
- Rossi S, Toigo C, Hars J, Pol F, Hamann JL, Depner K, Potier MF. 2011. New insights on the management of wildlife diseases using multi-state recapture models: The case of classical swine fever in wild boar. *PLoS One*. 6(9). doi:10.1371/journal.pone.0024257.
- Rouco C, Abrantes J, Serronha A, Lopes AM, Maio E, Magalhães MJ, Blanco E, Bárcena J, Esteves PJ, Santos N, et al. 2018. Epidemiology of RHDV2 (*Lagovirus europaeus*/GI.2) in free-living wild European rabbits in Portugal. *Transbound Emerg Dis*. 65(2):e373–e382. doi:10.1111/tbed.12767.
- Sharma D, Yadav UB, Sharma P. 2009. The concept of sensitivity and specificity in relation to two types of errors and its application in medical research \* Deptt . of Statistics and Demography , Post Partum Programme \*\* Deptt . of Orthopaedics. *J Reliab Stat Stud*. 2(2):53–58.
- Strive T, Piper M, Huang N, Mourant R, Kovaliski J, Capucci L, Cox TE, Smith I. 2020. Retrospective serological analysis reveals presence of the emerging lagovirus RHDV2 in Australia in wild rabbits at least five months prior to its first detection. *Transbound Emerg Dis*. 67(2):822–833. doi:10.1111/tbed.13403.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 356(1411):983–989. doi:10.1098/rstb.2001.0888.
- Villafuerte, R. & Delibes-Mateos, M. 2019. *Oryctolagus cuniculus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T41291A45189779. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T41291A45189779.en>

## ANEXOS

### Anexo 1 - Matrizes do Modelo da Mixomatose

Estados iniciais	Mixomatose + a	Mixomatose + u	Mixomatose - a	Mixomatose - u	Morto
	a	/	1-a	/	/

Tabela 1 – Matriz dos estados iniciais.

Sobrevivência	Mixomatose + a	Mixomatose + u	Mixomatose - a	Mixomatose - u	Morto
Mixomatose + a	b	/	/	/	1-b
Mixomatose + u	/	b	/	/	1-b
Mixomatose - a	/	/	b	/	1-b
Mixomatose - u	/	/	/	b	1-b
Morto	/	/	/	/	1

Tabela 2 – Matriz de sobrevivência entre campanhas.

Transição	Mixomatose + a	Mixomatose + u	Mixomatose - a	Mixomatose - u	Morto
Mixomatose + a	1-c	/	c	/	/
Mixomatose + u	/	1-c	/	c	/
Mixomatose - a	c	/	1-c	/	/
Mixomatose - u	/	c	/	1-c	/
Morto	/	/	/	/	1

Tabela 3 – Matriz de transição entre estados entre campanhas.

Consciência da armadilha/ Detecção	Mixomatose + a	Mixomatose + u	Mixomatose - a	Mixomatose - u	Morto
Mixomatose + a	d	1-d	/	/	/
Mixomatose + u	d	1-d	/	/	/
Mixomatose - a	/	/	d	1-d	/
Mixomatose - u	/	/	d	1-d	/
Morto	/	/	/	/	1

Tabela 4 – Matriz da consciência da armadilha entre campanhas.

Testado na condição de ser capturado	Não capturado	Mixomatose + a	Mixomatose + u	Mixomatose - a	Mixomatose - u	DHV não testada
Mixomatose + a	/	1-e	/	/	/	e
Mixomatose + u	1	/	/	/	/	/
Mixomatose - a	/	/	/	1-e	/	e
Mixomatose - u	1	/	/	/	/	/
Morto/ Não capturado	1	/	/	/	/	/

Tabela 5 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser testado aquando a sua captura.

Observações	0	1	2	3
Não capturado	1	/	/	/
Mixomatose + a	/	1-f	f	/
Mixomatose + u	1	/	/	/
Mixomatose - a	/	f	1-f	f
Mixomatose - u	1	/	/	/
Mixomatose não testada	/	/	/	1

Tabela 6 – Matriz que estima a probabilidade de um animal ser incorretamente classificado.

The screenshot displays the GEPAT interface with four panels arranged in a 2x2 grid. Each panel has a title bar, a 'Pre-defined Patterns' section, a 'Parameters' section, and an 'Input-Output for patterns' section.

- Top-Left Panel (Initial State):**
  - Pre-defined Patterns: Diagonal Matrix, Empty Matrix, Full Matrix.
  - Parameters: Number of steps: 1, Current step & Label: 1, IS.
  - Matrix Pattern: A 1x4 matrix with values 1, 2, 3, 4.
  - Options: # of Rows: 1, 4, Update Now.
  - EXIT button.
- Top-Right Panel (Transition):**
  - Pre-defined Patterns: Diagonal Matrix, Empty Matrix, Full Matrix.
  - Parameters: Number of steps: 3, Current step & Label: 1, S.
  - Matrix Pattern: A 5x5 matrix with values 1, 2, 3, 4, 5.
  - Options: # of Rows: 5, 5, Update Now.
  - EXIT button.
- Bottom-Left Panel (Transition):**
  - Pre-defined Patterns: Diagonal Matrix, Empty Matrix, Full Matrix.
  - Parameters: Number of steps: 3, Current step & Label: 2, D.
  - Matrix Pattern: A 5x5 matrix with values 1, 2, 3, 4, 5.
  - Options: # of Rows: 5, 5, Update Now.
  - EXIT button.
- Bottom-Right Panel (Event):**
  - Pre-defined Patterns: Diagonal Matrix, Empty Matrix, Full Matrix.
  - Parameters: Number of steps: 2, Current step & Label: 2, C.
  - Matrix Pattern: A 6x6 matrix with values 1, 2, 3, 4, 5, 6.
  - Options: # of Rows: 5, 6, Update Now.
  - EXIT button.

Figura 1 – matrizes inseridas no módulo GEPAT.



Transition

[0,1]

Coordinates beta values are with nonzero elements of the constraint matrix with  
 F=Departure  
 To=Arrival  
 T=Time  
 A=Age  
 G=Group  
 S=Step

	F	T	A	G	S		Fixed Value ?	Initial Value of Beta
Beta #1	1	1	1	1	1		<input checked="" type="checkbox"/>	1
Beta #2	1	1	5	1	1		<input type="checkbox"/>	0.5032
Beta #3	3	3	1	1	1		<input checked="" type="checkbox"/>	1
Beta #4	3	3	5	1	1		<input type="checkbox"/>	0.49699
Beta #5	1	3	1	1	2		<input checked="" type="checkbox"/>	0
Beta #6	1	3	5	1	2		<input checked="" type="checkbox"/>	0
Beta #7	3	1	1	1	2		<input checked="" type="checkbox"/>	0
Beta #8	3	1	5	1	2		<input checked="" type="checkbox"/>	0
Beta #9	1	1	1	1	3		<input type="checkbox"/>	0.40407

Event

[0,1]

Coordinates beta values are with nonzero elements of the constraint matrix with  
 F=Departure  
 To=Arrival  
 T=Time  
 A=Age  
 G=Group  
 S=Step

	F	T	A	G	S		Fixed Value ?	Initial Value of Beta
Beta #1	1	6	1	1	1		<input checked="" type="checkbox"/>	0.3636
Beta #2	4	2	1	1	2		<input type="checkbox"/>	0.26227
Beta #3	2	3	1	1	2		<input checked="" type="checkbox"/>	0
Beta #4	4	3	1	1	2		<input type="checkbox"/>	0.23799
Beta #5	2	4	1	1	2		<input type="checkbox"/>	0.25194
Beta #6	4	4	1	1	2		<input checked="" type="checkbox"/>	0
Beta #7	2	5	1	1	2		<input type="checkbox"/>	0.25166

Figura 3 – Valores fixados no IVFV

## Anexo 2 – Parametrização dos modelos

Parametrização de modelos						nP	Desvio	AIC	$\Delta AIC$
#	Sobrevivência (S)	Serologia ( $T_{serology}$ )	Trap- awareness ( $T_{awareness}$ )	Testagem (M)	Atribuição do Estado (B)				
1.1	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	Prob. A/U+ to A/U- = 0 Prob. A/U- to A/U+ = 0 Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	23	461.15	507.15	0
1.2	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	Prob. A/U+ to A/U- = 0 <b>Prob. A/U- to A/U+ constante</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	24	461.40	509.40	2.25
1.3	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	<b>Prob. A/U+ to A/U- constante</b> <b>Prob. A/U- to A/U+ constante</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	25	461.15	511.15	4.00

**Tabela S1.** Parametrizações do modelo de captura-marcação-recaptura multi-eventos mais suportado e outros modelos relevantes - DHV2/teste 1 no local Noudar. Corte ótimo 2.0. Diferenças na parametrização do modelo para o modelo melhor ajustado em negrito.

**nP**, número de parâmetros calculáveis;  **$\Delta AIC$** , diferença entre o **AIC** do modelo atual e o do modelo melhor ajustado.

Parametrização de modelos						nP	Desvio	AIC	$\Delta AIC$
#	Sobrevivência (S)	Serologia ( $T_{serology}$ )	Trap- awareness ( $T_{awareness}$ )	Testagem (M)	Atribuição do Estado (B)				
2.1	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	Prob. A/U+ to A/U- = 0 Prob. A/U- to A/U+ = 0 Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.355	Constante	41	633.12	715.12	0
2.2	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	Prob. A/U+ to A/U- = 0 <b>Prob. A/U- to A/U+ constante</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.355	Constante	42	633.12	717.12	2.00
2.3	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	<b>Prob. A/U+ to A/U- constante</b> <b>Prob. A/U- to A/U+ constante</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.355	Constante	43	635.28	721.28	6.16

**Tabela S2.** Parametrizações do modelo de captura-marcação-recaptura multi-eventos mais suportado e outros modelos relevantes - DHV2/teste 1 no local Lezírias. Corte ótimo 2.0. Diferenças na parametrização para o modelo melhor ajustado em negrito.

**nP**, número de parâmetros calculáveis;  **$\Delta AIC$** , diferença entre o **AIC** do modelo atual e o do modelo melhor ajustado.

Parametrização de modelos									
#	Sobrevivência (S)	Serologia ( $T_{serology}$ )	Trap-awareness ( $T_{awareness}$ )	Testagem (M)	Atribuição do Estado (B)	nP	Desvio	AIC	$\Delta AIC$
3.1	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	Prob. A/U+ to A/U- = 0 Prob. A/U- to A/U+ constante Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	24	496.15	544.15	0
3.2	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	<b>Prob. A/U+ to A/U- constante</b> <b>Prob. A/U- to A/U+ constante</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	25	496.15	546.15	2.00
3.3	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	<b>Prob. A/U+ to A/U- = 0</b> <b>Prob. A/U- to A/U+ = 0</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	23	501.09	547.09	2.94

**Tabela S3.** Parametrizações do modelo mais apoiado de captura-marcação-recaptura multieventos e outros modelos relevantes - MYXV/teste 4 no local Noudar. Corte ótimo 2.5. Diferenças na parametrização do modelo para o modelo melhor ajustado em negrito.

**nP**, número de parâmetros calculáveis;  **$\Delta AIC$** , diferença entre o **AIC** do modelo atual e o do modelo melhor ajustado.



Parametrização de modelos									
#	Sobrevivência (S)	Serologia ( $T_{serology}$ )	Trap-awareness ( $T_{awareness}$ )	Testagem (M)	Atribuição do Estado (B)	nP	Desvio	AIC	$\Delta AIC$
4.1	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	Prob. A/U+ to A/U- = 0 Prob. A/U- to A/U+ = 0 Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	41	642.93	724.93	0
4.2	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	Prob. A/U+ to A/U- = 0 <b>Prob. A/U- to A/U+ constante</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	42	642.83	726.83	1.90
4.3	Efeito serológico Fixado = 1 entre sessões	<b>Prob. A/U+ to A/U- constant</b> <b>Prob. A/U- to A/U+ constant</b> Fixado = 0 entre sessões	Efeito da idade e da armadilha	Prob. de não ser testado = 0.150	Constante	43	642.93	728.93	4.00

**Tabela S4.** Parametrizações do modelo de captura-marcação-recaptura multi-eventos mais apoiado e outros modelos relevantes - MYXV/teste 4 no site Lezírias. Corte ótimo 2.5. Diferenças na parametrização do modelo para o modelo melhor ajustado em negrito.

**nP**, número de parâmetros calculáveis;  **$\Delta AIC$** , diferença entre o **AIC** do modelo atual e o do modelo melhor ajustado.